THESE

présentée à

LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS

pour l'obtention du titre

de DOCTEUR de l'UNIVERSITE de PARIS

(mention Sciences)

par Monsieur Shambhunath PYAKURAL

Sujet : ETUDE DE L'ADAPTATION DU VIRUS DE LA GRIPPE DU CHEVAL AUX CULTURES CELLULAIRES ET PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES DU VIRUS

Soutenue le 31 mai 1972 devant la Commission

composée de : Président Monsieur J. André THOMAS

Examinateurs Monsieur Claude ROZÉ

Invité Monsieur Pierre LEPINE

THESE

présentée à

LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS

pour l'obtention du titre

de DOCTEUR de l'UNIVERSITE de PARIS

(mention Sciences)

par Monsieur Shambhunath P Y A K U R A L

Sujet : ETUDE DE L'ADAPTATION DU VIRUS DE LA GRIPPE DU CHEVAL AUX CULTURES CELLULAIRES ET PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES DU VIRUS

Soutenue le _____ devant la Commission

composée de : Président Monsieur J. André THOMAS

Examinateurs Monsieur Claude ROZÉ

Invité Monsieur Pierre LEPINE

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

REMERCIEMENTS

J'adresse mes très respectueux remerciements à Monsieur le Professeur J.A. Thomas, Professeur à la Faculté des Sciences, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse, et m'avoir prodigué ses précieux conseils tout au long de mon travail.
- Monsieur le Professeur C. Rosé et Monsieur le Professeur Lépine pour avoir bien voulu accepter de faire partie du Jury.

J'exprime à Monsieur le Docteur Maurin, Chef de l'Unité de Virologie Médicale à l'Institut Pasteur, ma vive reconnaissance de la confiance dont il m'a témoigné dans la réalisation du présent travail. Je le remercie d'avoir bien voulu réviser et mettre au clair la version manuscrite de la présente thèse.

Je remercie Madame J. Virat, Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur pour avoir mis si aimablement à ma disposition tout ce dont j'ai eu besoin dans mes recherches et pour m'avoir aidé de ses conseils à tout moment.

Je remercie également Monsieur le Professeur Atanasiu, Chef du Service de la Rage à l'Institut Pasteur de ses bons conseils et de l'aide matérielle qu'il m'a offert dans l'expérience de l'immunofluorescence.

Je remercie Mademoiselle le Docteur Thibon, pour m'avoir si aimablement fourni les cultures cellulaires pendant mes expériences, ainsi que Madame le Docteur Prévot, Laboratoire de Diagnostic de l'Unité de Virologie Médicale, pour la bonne volonté avec laquelle elle m'a aidé dans la dernière partie de ce travail.

Je remercie Madame N. Chaumont pour avoir eu l'amabilité de mettre au point la forme et la présentation de la présente thèse, ainsi que Mademoiselle G. Remère pour son assistance technique.

Enfin, je remercie toutes les personnes du Service des Virus et du Service de la Rage de l'Institut Pasteur qui m'ont aidé tout au long de ce travail, et notamment Mlle Bezançon, Mme Blin, Mme Carlier, Mme Carré, M. Chevallier, Mme Fournier, Mlle Goussef, Mme Grosset, Mlle Launay, Mlle Tain, Mlle Tardy-Panit, M. Tsiang, M. Velch, Mlle Virat.

J'exprime ma gratitude à Son Excellence Sardul S.J.B. Rana, Ambassadeur du Népal à Paris pour les encouragements qu'il m'a donné ainsi que le Premier Secrétaire de l'Ambassade Royale du Népal M. S.N. Bhattarai et Mme Bhattarai de leur sympathie et la bonne volonté dont ils ont fait preuve envers moi durant mon séjour à Paris.

Je remercie également le Personnel de l'Ambassade Royale du Népal.

Je remercie mes amis, MM A.B. Karki, Subodi, N.C. De Souja et C.P. Grover pour la sympathie qu'ils m'ont témoigné pendant mon séjour.

Je remercie les services du C.R.O.U.S. de Paris, qui se sont sont occupés de mes affaires quotidiennes et de ma bourse et qui m'ont toujours réservé un bon accueil. Leur coopération a grandement facilité mon séjour en France.

Je dois mes très vifs remerciements au Gouvernement Royal du Népal qui m'a accordé une longue permission pour mener à bien les recherches qui ont fait l'objet de ce travail.

Finalement, je désire remercier le Gouvernement Français pour m'avoir attribué une bourse et avoir rendu ainsi mon séjour en France fructueux et agréable.

TABLE DES MATIERES

Introduction 1

Historique 4

Caractéristiques du virus 4

Hémagglutination et hémadsorption 5

Classification 5

Structure antigénique des virus grippaux 6

Cycle de multiplication du virus grippal 7

Multiplication et isolement du virus in vitro 8

Isolement du virus sur animal 9

Isolement sur cultures cellulaires 9

Etudes Sérologiques 10

Epreuve d'inhibition de l'hémagglutination 10

Epreuve de fixation du complément 11

Epreuve de Séroneutralisation 11

Immunofluorescence 12

Epreuve d'Immunodiffusion 12

Relation entre les grippes humaines et animales ... 13

Matériel et Techniques 15

Souches de virus 15

Cultures Cellulaires 15

Cellules Rein de Singe 16

Cellules Rein de foetus de cheval 16

Cellules fibroblastes d'embryons de poulet 16

Cellules Rein de veaux embryonnaires 16

Cellules Vero 17

Passages des souches virales en cultures cellulaires 17

Inoculation des cellules 18

Production d'hémagglutinine et d'antigène fixant le complément en cultures cellulaires et sur embryons de poulet 19

Titrage de l'hémagglutinine 20

Titrage de l'antigène soluble pour fixation du complément 21

Titrage infectieux 22

Titrage hémadsorbant 23

Apparition de l'hémadsorption 23

Réactions Sérologiques 23

Epreuve de Séroneutralisation 23

Epreuve de Neutralisation de l'hémadsorption.... 24

Inhibition de l'hémagglutination (IHA) et réaction d'IHA croisées 25

Fixation du complément et réactions croisées ... 26

Immunodiffusion 27

Immunofluorescence 27

Méthode indirecte 29

Méthodes directes 29

Histopathologie 30

Résultats 32

Multiplication du virus grippal en cultures cellulaires 33

Cellules rein de singe 33

Cellules rein de foetus de cheval 33

Cellules d'embryon de poulet 33

Cellules embryonnaires de mouton 35

Cellules Vero 40

Cellules rein de veau 40

Production de l'hémagglutinine et l'antigène S fixant le complément 45

Production d'hémagglutinine sur différents types cellulaires 48

Agglutination des érythrocytes de différentes espèces d'animaux 48

Apparition d'hémadsorption en cultures cellulaires 48

Titrage du virus en cultures cellulaires par effet cytopathogène et hémadsorption.. 50

Inhibition de l'hémagglutination et l'hémagglutination croisée 54

Fixation du complément et épreuves croisées correspondantes 58

Immunodiffusion (ID) 61

ID avec immunsérum 61

ID avec du sérum de vacciné 61

Anticorps fluorescents 70

Histopathologie 78

Discussion 80

Multiplication du virus en cultures cellulaires 80

Cycle de croissance du virus grippal 85

Fixation du complément et réactions croisées. 88

Inhibition de l'hémagglutination et réactions croisées 90

Immunodiffusion 92

Immunofluorescence 96

Résumé et Conclusion 100

Bibliographie 105

INTRODUCTION

La grippe de l'homme et des animaux a été décrite depuis l'antiquité. Bien que des études déjà très vastesaient été faites, les virus de la grippe fournissent encore un large champ d'investigation aux biologistes.

Une revue des plus anciennes publications montre que les affections respiratoires du cheval sont depuis longtemps un problème. Gibson (1754) a décrit les manifestations cliniques et les caractéristiques épizootiques de la maladie. Fleming (1871) a étudié de nombreuses manifestations d'affections respiratoires chez le Cheval; certaines sont suffisamment bien décrites pour permettre un diagnostic rétrospectif.

En 1956, Heller et coll. trouvèrent dans le sérum des chevaux atteints d'une maladie de type grippal, des anticorps réagissants avec l'antigène soluble du virus grippal A et des chercheurs tchèques confirmèrent l'existance de la grippe équine par l'isolement du virus A/equi 1/Prague/56 (Sovinova et coll., 1958). En 1963, une épidémie de grippe équine due au virus A/equi 1 survient en Angleterre, alors qu'aux Etats-Unis on observe une épidémie due à un virus de type 2, nommé par la suite A/equi 2/Miami/63 (Waddell et coll., 1963). Après ces découvertes, la grippe équine a été définie comme une entité virologique et l'étude systématique de cette affection a pu être entreprise

Trois groupes immunologiques distincts du virus grippal ont été décrits comme type A, B, C en liaison avec la spécificité de l'antigène soluble "S" en fixation du complément (Lennette et Horsfall, 1940; Lief et Henle, 1956; Lief et coll., 1958; Lief, 1963). L'antigène externe "V" est l'enveloppe lipoprotéique qui supporte l'hémagglutinine; il est spécifique de type et de sous-type (Fabiyi et coll., 1958).

Andrewes et coll.,(1965)emploient le terme "Myxovirus" pour distinguer un groupe de virus ayant une affinité pour les substances mucoprotéiques. Les virus du groupe ont un diamètre de 60 à 200 mμ et ont la propriété d'adsorption et d'élution spontanée de la surface des érythrocytes; ils ont l'acide ribonucléique comme caractère génétique.

Francis et Magill (1936) ainsi que Hyde et Chapman (1937) montrèrent que les virus de la grippe pouvaient être isolés de l'homme par inoculation sur la membrane chorioallantoïque de l'oeuf de poule en incubation. Beveridge et Burnet (1946) développèrent les techniques avec l'utilisation des oeufs embryonnés qui deviennent de la plus grande importance dans les recherches sur le virus grippal.

Après l'introduction des cultures cellulaires en virologie,nombre de cellules furent utilisées dans l'étude des propriétés du virus : cellules primaires de rein de singe (Mogabgab et coll., 1955); cellules de rein de veau (Lehmann-Grube et Fazekas de St. Groth, 1965); fibroblastes d'embryon de poulet (Granoff, 1955); et cellules diploïdes humaines lignées WI - 38 (Tumova et Fedova, 1968).

Après la découverte de l'activité hémagglutinante du virus de la grippe (Hirst, 1941; McClelland et Hare, 1941) et de son inhibition spécifique par les anticorps, cette propriété a été largement utilisée pour le diagnostic et la différenciation des souches isolées.

Fairbrother et Hoyle (1937) et Hoyle et Fairbrother (1947) utilisaient l'épreuve de fixation du complément avec des extraits de poumon de souris comme antigène; plus tard, Lief et Henle (1959) décrivirent les techniques de préparation des antigènes et sérums spécifiques qui sont actuellement d'un usage courant, avec quelques modifications.

A côté de l'hémagglutination et de la fixation du complément, les épreuves d'immunoprécipitation en gélose ont été utilisées pour étudier la compléxité antigénique du virus grippal (Styk et Hana, 1966).

Watson et Coons (1954) montrèrent, par la méthode d'immunofluorescence, que l'antigène viral apparaissait d'abord dans le noyau, et dans un stade ultérieur, était mis en évidence dans le cytoplasme (Holtermann et coll., 1960).

La plupart des travaux concernant le virus grippal ont été faits à partir des souches humaines. Le présent travail concerne les différents aspects du virus de la grippe équine, y compris son adaptation à différents systèmes cellulaires. Nous nous sommes attaché au développement de l'hémagglutinine et de l'antigène soluble en culture cellulaire. Des essais ont également été faits concernant la normalisation des techniques d'immunofluorescence et de diffusion en gélose. Une revue de la littérature concernant la question commence notre exposé.

HISTORIQUE

CARACTERISTIQUES DU VIRUS

Andrewes et coll., (1955) appelèrent "Myxovirus" un groupe de virus ayant une affinité mucoprotéique. Les virus du groupe mesurent 60 - 200 nm de diamètre et ont la propriété d'adsorption et d'élution vis-à-vis des érythrocytes de plusieurs espèces animales mais principalement de poulet.

Les membres du groupes actuellement connus sont les suivants :

1) Grippe A, B, C.
2) Parainfluenza type 1, 2, 3, 4.
3) Virus de la maladie de Newcastle.
4) Virus des oreillons.
5) Certains virus de singe.
6) Virus de la maladie de Carré.
7) Virus de la peste bovine.
8) Virus respiratoire syncytial. 9) Rougeole.

Sous -comité des virus du Comité de Nomenclature International 1963, Sous-comité International de la Nomenclature des virus, 1963).

Les particules des myxovirus sont formées par un acide ribonucléique monocaténaire, dont la nucléoprotéine centrale est entourée d'une enveloppe lipoprotéique (Horneand, Wildy, 1963). L'affinité sélective des myxovirus pour les récepteurs mucoprotéiques présents à la surface des érythrocytes avec adsorption et élution de ces cellules est commune aux membres de ce groupe à l'exception des virus de la rougeole de la maladie de Carré, de la peste bovine et du virus respiratoire syncytial. L'agglutination des virus à la surface des globules rouges et son élution spontanée (Hirst, 1941, 1942 a; McClelland et Hare, 1941) est une réaction enzymati-

que qui est apportée par l'enzyme virale, la neuraminidase (Gottschalk

1°) - HEMAGGLUTINATION ET HEMADSORPTION

Hirst (1941) et McClelland et Hare (1941) découvrirent en même te le phénomène de l'agglutination des érythrocytes de poule par le virus la grippe. La découverte devint d'un intérêt général en virologie, l'hé glutination (HA) s'étant révélée une excellente méthode pour la mise en évidence et le titrage des virus. L'inhibition de l'hémagglutination (par les anticorps spécifiques fournit une méthode sensible pour la rech che de l'activité anti-virale des sérums. Hirst (1942 b), Vogel et Shelokov (1957) et Shelokov et coll. (1958) décrivent l'hémadsorption et l'inhibition de l'hémadsorption (IHad) qui sont les conséquences for nelles de l'HA et l'IHA. Ces techniques sont utiles pour révéler des vi et anticorps qui ne pourraient l'être par l'HA et l'IHA.

Il a également été démontré que le sérum normal et autres liquides biologiques pouvaient contenir des inhibiteurs viraux (Anderson, 1948; Stone, 1949). Les inhibiteurs du sérum normal (Tyrrell, 1954; Ginsberg Horsfall, 1949) ont une grande importance pratique, on doit en tenir compte dans l'interprétation des résultats.

2°) - CLASSIFICATION

Les virus de la grippe sont divi és en 3 types A, B et C, sur la base de la ribonucléoprotéine spécifique de type, qui représente l'anti gène soluble dans l'épreuve de fixation de complément (FC).

La séparation en sous-types des souches est faite sur la base de la mise en évidence de l'antigène externe V dans les épreuves de neutralis tion (N), d'IHA et de FC avec un antigène spécifique de souche. Tous le virus grippaux des animaux isolés à ce jour appartiennent au type A.

Pereira et coll., (1967) proposent un système de classification simple basé sur les épreuves d'hémagglutination croisée.

La classification des virus de la grippe peut-être envisagée de la façon suivante :

Type A

Hominis

1 A/PR 8/34
2 A1/FM/1/47
3 A2/JAPON/305/57

Suis

1 - A/Swine/1976/32

Equi

1. A/Equi-1/Prague/2/56
2. A/Equi-2/Miami/1/63

Aviae

1 A/Fowl Plague -Dutch Str. A/Turkey/England/63
2 Virus N/49
3 A/Duck/England/56
4 A/Duck/Czechoslovaki /56
5 A/Chicken/Scotland/59
6 A/Turkey/Canada/63
A/Turkey/Massachusett/5740/63
A/Turkey/Wisconsin/68

Type B

1 B/Lee/40
2 B/Great-Lakes/47
3 B/Maryland/1/59

Type C

Hominis

1/C/Taylor/1233/47

A/Duck/England/62
A/Tern/South Africa/61
A/Turkey/Californie/63

3°) - STRUCTURE ANTIGENIQUE DES VIRUS GRIPPAUX

D'excellentes mises aux points ont été récemment publiées qui donnent une description très précise de la structure antigénique du virus grippal (Pereira, 1969; Webster et Laver, 1971). Deux composants structuraux principaux peuvent être distingués dans le virus de la grippe : la nucléocapside qui est une ribonucléoprotéine (Hoyle, 1952; Ada et Perry, 1954) et l'enveloppe qui comprend au moins deux antigènes : l'hémagglutinine et la neuraminidase, identifiées comme étant des protéines distinctes (Howe et coll., 1961 a, b; Seto et coll., 1966). D'autres constituants ont été décrits (Knight, 1946; Smith et coll., 1953) avec une prédominance de glucides (Laver et Wabster, 1966).

Les virus grippaux sont divisés en trois types A, B et C sur la base de la spécificité de l'antigène S en fonction du complément. Cet antigène représente la ribonucléoprotéine (Lennette et Horsfall, 1940; Lief et Henle, 1956; Lief et coll., 1958; Lief, 1963). Chez les animaux seul le type A a été retrouvé. Il n'y a pas de réaction croisée entre les types.

Les antigènes d'enveloppe, hémagglutinine et neuraminidase permettent de différencier des sous-types par l'épreuve d'inhibition de l'hémagglutination (McClelland et Hare, 1941), de neutralisation et de fixation du complément spécifique de souche (Fabiyi et coll., 1958).

La neuraminidase constitue un deuxième antigène de surface, indépendant de l'hémagglutinine (Seto et Rott, 1966; Webster et Laver, 1967). En règle générale, l'enzyme virale est inhibée par l'anticorps homologue et non par l'anticorps anti-enzyme des cellules infectées. Les anticorps anti-neuraminidase (Webster et Laver, 1967) n'ont pas d'activité anti-hémagglutinante (Seto et Rott, 1966), mais donnent en fixation du complément une réaction positive révélant la présence des neuraminidases communes aux différents sous-types.

4°) - CYCLE DE MULTIPLICATION DU VIRUS GRIPPAL

Les études sur le cycle de multiplication du virus grippal ont été faites par Henle, Henle et Rosenberg (1947), les premiers. Si un oeuf est inoculé et les titres hémagglutinants et infectieux du liquide allantoïque mesurés à différents temps, on constate une augmentation régulière des titres (Hoyle, 1968). Des résultats semblables ont été obtenus en culture sur membrane chorioallantoïque (Horvath, 1958) et en cellules de rein de singe (Sugiura et coll., 1962).

Hoyle (1968) a parfaitement décrit la phase de multiplication intracellulaire du virus; le même auteur en 1948 a, et 1952 a,c, alors qu'il étudiait le développement intracellulaire du virus, avait noté qu'il n'y avait pas d'augmentation du virus infectieux jusqu'à la 5ème ou 6ème heure après l'infection mais que l'antigène S pouvait être retrouvé par FC à 2 heures et atteignait son titre maximal en 5-6 heures. Il avait également noté que l'hémagglutinine était mise en évidence vers la 3ème heure et augmentait rapidement entre 3 et 5 heures. La multiplication du virus infectieux intervenait après 6 heures et des petites quantités seulement étaient retrouvées dans la membrane : le virus était immédiatement éliminé vers le liquide allantoïque.

Cependant le cycle de multiplication intracellulaire du virus passe par différents stades:

a) attachement du virus à la cellule -Stade d'adsorption.
b) Stade de pénétration - Eclipse.
c) Stade intranucléaire.
d) Stade cytoplasmique et finalement,
e) Stade de maturation et de libération du virus.

5°) - MULTIPLICATION ET ISOLEMENT DU VIRUS IN VITRO

Les détails sur l'isolement du virus ont été donnés par Daveport et Minus (1946).

Les prélèvements à préférer sont les écouvillonnages nasaux et les lavages du nez faits dans les 48 premières heures de la maladie.

a) Isolement du virus sur l'embryon de poulet

Les embryons de poulet ont été utilisés comme le milieu le plus sensible pour l'isolement du virus grippal. Le virus peut-être inoculé dans l'allantoïde, l'amnios, le sac vitellin, sur la membrane chorio-allantoïque, directement dans l'embryon ou par la voie intraveineuse. Cependant, l'inoculation dans la cavité allontoïque

recommandée par Burnet (1940) est de loin la meilleure méthode pour l'isolement du virus grippal des animaux.

b) Isolement du virus sur animal

Outre l'embryon de poulet, les animaux tels que le furet (Smith, Andrewes et Laidlaw, 1933), la souris (Burnet et Foley, 1941), le rat (Chalkina et Gulamov, 1943) et le hamster (Taylor et Parodi, 1942) ont été également utilisés pour l'isolement du virus grippal.

c) Isolement sur cultures cellulaires

Mogabgab et coll. (1955) ont tenté avec succès l'isolement du virus grippal sur cellules primaires de rein de singe. McQueen et coll. (1968) pensent que ces cellules sont un bon système pour l'isolement du virus de type B. Le virus A/Equi 2 se multiplie aisément en cellules RS : tous les essais pour adapter le virus A/Equi 1 sur ces cellules ont échoué. Lehmann-Grube (1964) ont mis au point la culture du virus grippal sur cellules de rein de veau. Lehmann-Grube et Fazekas de St. Groth (1965) montrent que le virus A2 peut être adapté aux cellules de rein de veau. Récemment Fontaine et Petermann (1969) ont décrit l'adaptation à ce système d'une souche A2 équine isolée en France. Des essais d'adaptation du virus ont également été tentés sur les cellules suivantes :

- Fibroblastes embryonnaires de poulet (Stulberg et Schapira, 1953), rein embryonnaire de poulet (Heath et Tyrrell, 1959, rein de poulain (Fontaine et Petermann, 1969), rein de furet (Hass et Wulff, 1955), rein de hamster (Heath et Tyrrell, 1959), cellules Hela (Henle, Girardi et Henle, 1955), cellules diploïdes humaines (Tumova et Fedova, 1968), rein de chien (MDCK) (Gaush et Smith, 1968) et rein de boeuf (MDEK) (Choppin, 1969). Fontaine et Petermann (1969) ont décrit l'adaptation de la souche A/equi 1/Prague/56 aux cellules BHK 21.

6°) - ETUDES SEROLOGIQUES

Les détails du diagnostic de la grippe sont donnés dans le rapport technique de l'OMS, série n° 170 (Comité d'experts dans les maladies à virus respiratoires 1959) et par Daveport et Minus (1964).

a) Epreuve d'inhibition de l'hémagglutination (IHA)

C'est le procédé sérologique le plus communément utilisé dans le diagnostic de la grippe, procédé par lequel le titre des anticorps des malades est mesuré par la capacité qu'a le sérum d'empêcher l'agglutination des érythrocytes par une dose déterminée de virus d'épreuve. Cette technique, pour le diagnostic de la grippe, a été introduite par Hirst (1942 a). Puis, Hirst et Pickels (1942) et Salk (1944) ont développé la méthode d'estimation de la contenance du sérum en anticorps par l'épreuve d'inhibition de l'hémagglutination. McQueen et coll., (1968) ont précisé que, dans le cas d'une première infection, les anticorps sont presque totalement spécifiques de souches; de cette façon il peut être impossible de démontrer une augmentation significative (4 fois ou plus) du titre des anticorps entre le sérum de stade aigu et celui de convalescent si la souche en cause ne peut pas être utilisée comme antigène dans la réaction; au contraire ils ont noté que la réponse sérologique des animaux successivement exposés à deux virus au plus n'est pas spécialement spécifique de type. Ce phénomène s'appuie sur des bases solides (Daveport et coll., 1953, 1955; Hennessy et coll., 1955 a, b; Daveport et Hennessy, 1956, 1957; Campbell, 1959; McQueen et coll., 1965) et pose des problèmes quant au diagnostic chez de vieux animaux qui peuvent avoir été exposés successivement à deux souches ou plus, antigéniquement voisines.

Kaplan et Payne (1959) ont fait ressortir que les preuves obtenues par la méthode d'inhibition de l'hémagglutination dans des sérums animaux peuvent être d'une valeur limitée étant donné le problème des inhibiteurs non spécifiques présents dans le sérum; l'interprétation des résultats démontre une parfaite connaissance des méthodes utilisées pour l'élimination des inhibiteurs non spécifiques.

Les méthodes utilisées sont diverses; selon les auteurs ont fait agir le periodate de potassium (Hirst, 1949), le RDE du filtrat de Vibrio cholérae (Appleby et Stuart-Harris, 1950; Isaacs et Bozzo, 1951), la trypsine (Sampaio et Isaacs, 1953). Aucune de ces méthodes ne donne entière satisfaction.

b) Epreuve de fixation du complément (FC)

L'infection par le virus grippal provoque habituellement la production d'anticorps à la fois vis-à-vis de l'antigène S et de l'antigène V. L'antigène S, quelle que soit la souche, peut-être utilisé pour déterminer la spécificité de type (A, B et C) de la souche infectieuse. Cependant, les anticorps vis-à-vis de l'antigène S ne persistent guère plus de 6 mois après l'infection (Lief et Cohen, 1965; Beveridge et Rose, 1967). L'information obtenue par cette méthode est limitée, les résultats ne donnent aucune information sur la structure de l'antigène V de la souche infectante. Lief et Henle, (1959) ont décrit le mode de préparation des antigènes S et V et des sérums correspondants à partir des oeufs infectés par le virus grippal.

Suharto et Tumova, (1967) ont décrit qu'ils pouvaient préparer un antigène V et son immun-sérum, des souches A-Singapore 1/57 et B-Kosica 10/65 de virus grippal, en cellules de rein de singe. Mais ils ont été incapables de préparer l'antigène S et son sérum correspondant à partir du même système cellulaire.

c) Epreuve de Séroneutralisation (SN)

Smith, Andrexes et Leidlaw, (1953) montrèrent que les sérums de convalescents humains ou de furet neutralisent le virus et empêchent le développement d'une maladie fébrile chez les furets. L'adaptation du virus à la souris permet d'étudier plus facilement le pouvoir neutralisant des sérums. Les épreuves de neutralisation dans la cavité allontoïque de l'oeuf de poule embryonné sont largement utilisées. Hirst, (1942, c); Burnet et Beveridge, (1943) recherchent la présence des hémagglutinines

dans l'oeuf après l'inoculation du mélange virus-sérum.

Weinberger, Buescher et Edwards, (1965) utilisent des cellules de rein de singe pour les épreuves de neutralisation.

d) Immunofluorescence

Watson et Coons, (1954), après avoir marqué avec des anticorps fluorescents des cellules infectées par le virus grippal, montrèrent que l'antigène viral apparaissait d'abord dans le noyau, et Liu, (1955), confirma que la fluorescence nucléaire était due à l'antigène S.

Holtermann et coll., (1960) ont étudié le développement intracellulaire d'une souche grippale A2 en cellules embryonnaires de rein de veau, par la fluorescence; l'antigène est d'abord mis en évidence dans le noyau 6 heures après l'infection, on le retrouve dans le cytoplasme aux stades ultérieurs. Hills et coll., (1960) suivirent le développement des antigènes S et V en cellules Hela exposées à une multiplicité d'infection élevée d'un virus grippal A. Ils notèrent que l'antigène V ne se développait que dans le cytoplasme alors que l'antigène S était presque exclusivement localisé dans le noyau.

Des résultats identiques ont été obtenus par différents auteurs en cellules de rein de singe (Sugiura et coll., 1962) et en cellules d'embryon de poulet (Karmforin, 1968).

e) Epreuve d'Immunodiffusion (ID)

Jensen et Francis, (1953) virent que des lignes de précipitation pouvaient être obtenues en milieu solide en laissant tomber les préparations de virus à la surface d'une gélose imprégnée de sérum. Styk et Hana, (1966) employèrent la méthode d'Ouchterlony et trouvèrent que les particules virales intactes diffusaient lentement à travers la gélose, sans donner de résultat interprétable. Par contre, des résultats satisfaisants furent obtenus en utilisant des préparations de virus purifié et désintégré par

le déoxycholate de sodium. Styk et coll., (1970 a) examinèrent par cette méthode les séruns de chevaux immunisés avec différents virus A1 et A2; ils déclarèrent que cette technique était plus sensible que la technique d'inhibition de l'hémagglutination. Styk et coll., (1970 b) étudièrent la structure du virus grippal par cette méthode.

7°) - RELATION ENTRE LES GRIPPES HUMAINES ET ANIMALES

Koen, (1919) suggèra que les cycles de la grippe chez l'homme et les animaux pouvaient être étroitement liés. Il basait cette affirmation sur le fait que le porc avait attrapé la grippe de l'homme pendant la pandémie de 1918. Des épreuves de protection et de neutralisation croisées révèlèrent que les virus grippaux humains et porcins étaient proches mais non identiques (Shope, 1936; Smith et coll., 1935; Andrewes et coll., 1935; Francis et Shope, 1936).

Une autre preuve à l'appui des relations entre les virus grippaux de l'homme et des animaux a été révélée lors de la session annuelle de l'Association de la Santé Publique Américaine en 1963 où Voth et Feldman montrèrent que des anticorps contre le virus A/Equi 2 avaient été trouvés chez des personnes âgées. Ces faits furent confirmés par Minuse et coll., (1965) et McQueen, (1965).

Kasel et coll., (1969) ont infecté expérimentalement des volontaires humains avec le virus A/Equi 2 et ont constaté que ce virus provoquait l'apparition d'anticorps contre les variants humains de type A2 récemment identifiés.

Ils ont également démontré la réponse en anticorps A/Equi 2 chez des individus infectés naturellement avec un nouveau variant du type A2 humain. De ces observations on peut conclure que les virus humains et équins A2 portent un ou plusieurs antigènes communs. De semblables observations ont été également faites par d'autres auteurs (Couch et coll., 1969; Tumova et Pereira, 1968).

Cependant, McQueen et coll., (1969) ont nié les relations antigéniques significatives entre les virus humains et équins, les vaccins humains ou équins ne protégeant pas la souris contre le virus hétérologue; mais ils

ont pu prouver la présence d'anticorps inhibant l'hémagglutination vis-à-vis de virus humain A2 dans les sérums de chevaux guéris après une infection expérimentale par le virus A/Equi 2.

MATERIEL ET TECHNIQUES

SOUCHES DE VIRUS

La liste des souches de virus utilisées tout au long de cette étude figure sur le tableau 1. Ces souches proviennent toutes du Laboratoire National de Référence de la Grippe, à l'Institut Pasteur à Paris, où elles ont été entretenues par passages réguliers dans l'oeuf. Avant de les injecter aux cultures cellulaires, nous les avons passées au moins 2 ou 3 fois sur embryon de poulet de 11 jours. Les oeufs inoculés étaient incubés pendant 72 heures à 35°C, puis mis à la glacière à 4°C pour une nuit, afin d'éviter l'hémorragie des vaisseaux de la membrane au moment de l'ouverture. D'autres détails concernant les souches de virus grippal sont donnés par Schäfer, (1955), Pereira et coll., (1966), Rinaldi et coll., (1965). (Voir Tableau 1).

Souches	Abréviations employées	Hote	Année d'Isolement
A/Equi - 1/Prague/56	AE1/Prague	Cheval	1956
A/Equi - 2/Alfort/65	AE2/Alfort	Cheval	1965
A/Equi - 2/Miami/63	AE2/Miami	Cheval	1963
A/Equi - 2/New York/63	AE2/New York	Cheval	1963
A2/Hong Kong/1/68	A2/Hong Kong	Homme	1968
B/England/67	B/England	Homme	1967

CULTURES CELLULAIRES

Dans cette étude nous avons employé les cultures cellulaires suivantes :

a) Rein de singe (RS)

Des cultures de cellules primaires de rein de singe sont préparées à partir de rein de singe Cynolmogus par la méthode habituelle (Mogabgab et coll., 1955). Les tubes et les flacons sont ensemencés à raison de 3 à 4 x 10^5 cellules par millilitre de milieu, lequel est constitué à parties égales de liquide de Hanks et de milieu de Parker 199 modifié, avec 3 % de sérum de veau ainsi que 200 unités de pénicilline et 200 microgrammes de streptomycine par millilitre (ml). Le tapis de culture cellulaire continu est obtenu en 3 à 5 jours. Avant l'inoculation, on rince 3 fois la culture avec la solution équilibrée de Hanks. Le milieu d'entretien pour culture cellulaire après inoculation est constitué de solution de Hanks et de Parker 199 modifié avec antibiotiques, mais sans sérum.

b) Cultures de cellules embryonnaires de reins de foetus de cheval (RFC)

Nous trypsinons les reins de foetus de cheval de 5 à 6 mois. Ces organes sont prélevés stérilement à l'abattoir. On ensemence les tubes et flacons avec une suspension cellulaire à 0,30 % dans un milieu à l'hydrolysat de lactalbumine (HL) avec 15 % de sérum de veau, 200 unités de pénicilline et 200 microgrammes de streptomycine. Le tapis continu s'obtient en 5 à 6 jours. Avant de les inoculer, les cellules subissent deux lavages avec le milieu HL. Le milieu d'entretien est le milieu HL décrit ci-dessus avec antibiotiques, mais sans sérum.

c) Cultures de fibroblastes d'embryons de poulet (FEP)

Les fibroblastes d'embryons de poulet primaires sont préparés par trypsination d'embryons de 10 jours. Les cellules sont mises en suspension dans un milieu consistant en hydrolysat de caséine (HC) et solution de Hanks avec 10 % de sérum de veau et des antibiotiques. La suspension contient 7-8 x 10^5 cellules par ml. Le tapis continu est obtenu en 48 heures.

d) Cultures de cellules embryonnaires de rein de veau (RV)

Les reins sont recueillis sur des foetus de veau de 4 à 6 mois et trypsinés par la méthode habituelle (Lehmann-Grube et Fazekas de St. Groth, 1965). Les cellules sont mises en suspension en milieu HL à 10 %

de sérum de veau avec antibiotiques. Les tubes et flacons sont ensemencés avec une suspension à 5-6 x 10^5 cellules par ml. La culture confluente est obtenue en 3 à 5 jours.

e) Cultures de cellules de reins embryonnaires de mouton (RM)

Les cultures primaires de reins de foetus de mouton sont préparés exactement de la même façon que les RV.

f) Lignée continue de cellules Vero (Cellule de rein de singe Cearcopithèque. Cercopithecus aethicops)

Aux différents systèmes cellulaires que nous venons de voir, nous avons ajouté pour réaliser cette étude la lignée continue de cellules de cercopithèques dite "lignée Vero", que nous avons obtenue à l'Institut Pasteur à son 69ème passage. Partant de cultures confluentes de 3 à 5 jours en boîtes de Roux de 1 litre, contenant environ 6 à 9 x 10^7 cellules, nous avons utilisé pour le décollement un mélange de trypsine et de versène (sel de sodium de l'acide éthylène-diamine-tétra-acétique ou EDTA). Les cellules sont mises en suspension dans 300 ml de milieu synthétique BME renforcé en aminoacides essentiels et en vitamines, et additionné de 10 % de sérum de veau. Les proportions de pénicilline et streptomycine sont les mêmes que dans les cas précédents. Le milieu d'entretien ne contient que 3 % de sérum de veau, les autres produits demeurant les mêmes.

1°) - PASSAGE DES SOUCHES VIRALES EN CULTURES CELLULAIRES

Souches de virus

Nous n'avons utilisé pour les passages en cultures cellulaires que les souches de virus de grippe équine données dans le Tableau 1.

Cultures cellulaires

Des flacons de 60 ml ont été utilisés pour la culture des cellules mentionnées ci-dessus. Pour l'évaluation de l'hémadsorption des cultures, des tubes à essais ordinaires de 12 x 120 mm ont été employés.

Inoculation des cellules

Après avoir rejeté le milieu de croissance, on lave deux fois les cellules avec de la solution de Hanks et l'on introduit à la pipette 1 ml de virus pur, en suspension dans le liquide allontoïque, ce qui équivaut à 1 000 unités hémagglutinantes environ. Après 30 mn d'adsorption, on ajoute 10 ml de milieu d'entretien. Les résultats sont lus après 48, 72 et 96 heures, pour la recherche de l'hémadsorption (Had), de l'hémagglutination (HA) et de l'effet cytopathogène (ECP). Le virus intracellulaire est mis en évidence par l'hémadsorption sur des tubes de culture ordinaires en utilisant des érythrocytes de poulet à 0,5 %.

Après 72 à 96 heures, lorsque toutes les cellules sont détruites, les flacons sont congelés (cellules et milieu) en les plongeant dans l'alcool à - 70°C et décongelés à la température ordinaire. Ce processus de congélation-décongélation est répété 3 fois de manière à libérer la totalité du virus intracellulaire. Le milieu contenant le virus est centrifugé pour éliminer les débris cellulaires. Une partie du milieu obtenu est mis de côté pour être repassé dans l'oeuf; une autre partie sert au titrage de l'hémagglutinine, et le reste est employé pour les passages ultérieurs en cultures cellulaires.

Préparation de la suspension d'érythrocytes pour hémagglutination, inhibition d'hémagglutination (IHA), hémadsorption et inhibition d'hémadsorption (IHAd).

Globules rouges de poulet. On recueille du sang de 2 à 3 animaux en solution d'Alsever modifiée, et ce mélange est centrifugé à 1 500 tr/mn pendant 10 mn. Le culot globulaire est lavé 3 fois dans du soluté physiologique et l'on en fait une suspension à 50 %, également dans du soluté physiologique, que l'on garde à 4°C. A partir de là on prend la suspension d'usage à 0,5 % en soluté physiologique.

Les suspensions d'érythrocytes de cobaye, humains du groupe O, de singe rhésus, de rat et de mouton sont également réalisées suivant la même technique.

2°) - PRODUCTION D'HEMAGGLUTININE ET D'ANTIGENE FIXANT LE COMPLEMENT (Antigène S) EN CULTURES CELLULAIRES ET SUR EMBRYONS DE POULET

Cultures cellulaires utilisées

- Cellules RV, RM.
- Pour les cellules FEP on utilisé des embryons de 11 jours.

Souche virale

- AE 2/Alfort

Inoculation des cellules. Les cultures cellulaires en boîtes de Roux, contenant chacune environ 2 x 10^7 de cellules en moyenne, sont rincées deux fois au Hanks et inoculées avec 10 ml de virus contenant environ 10 000 unités hémagglutinantes. Après une période d'adsorption de 20 mn à + 37°C, l'inoculat est retiré, les cultures rincées deux fois puis renouvelées avec le milieu d'entretien. On retire de l'étuve deux boîtes aux temps suivants : 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 heures après l'infection. On considère que le début de l'infection est le moment où l'inoculat est introduit sur les cellules.

Préparation de l'hémagglutinine

Après chacun des intervalles de temps ci-dessus, le milieu est prélevé et mis de côté, considéré comme virus "libre". Le tapis cellulaire est lavé deux fois avec du Hanks et les cellules sont décollées avec une râclette en caoutchouc; on les met en suspension dans 3 ml de tampon barbital. Cette suspension est congelée dans un congélateur à alcool à -70°C et décongelée à la température du laboratoire. Ce processus est répété 2 fois, puis la suspension est traitée aux ultra-sons et clarifiée par centrifugation. Le liquide surnageant limpide est recueilli pour titrage de l'hémagglutinine.

Préparation de l'antigène S pour fixation du complément

Une partie du liquide surnageant limpide provenant de l'expérimentation ci-dessus est adsorbée deux fois par des globules rouges de poulet de manière à éliminer l'hémagglutinine libre et à l'utiliser comme antigène soluble.

Inoculation d'embryons de poulets

L'infection d'embryons de poulets de 11 jours est réalisée en inoculant 1 000 unités hémagglutinantes de virus dans la cavité allantoïque, les oeufs étant incubés ensuite à + 35°C. Quatre oeufs sont prélevés à chacun des intervalles suivants après l'inoculation : 2, 4 , 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 heures. Le début de l'infection est considéré comme étant le moment où le virus est introduit dans les oeufs.

Préparation de l'hémagglutinine

Les oeufs sont refroidis à + 4°C pendant la nuit avant le prélèvement. On les ouvre par la chambre à air et on recueille la membrane chorio-allantoïque. Celle-ci est lavée plusieurs fois avec du soluté physiologique jusqu'à ce que le liquide de lavage reste clair. Les membranes sont alors vigoureusement broyées et mises en suspension dans du tampon barbital à poids égal. La suspension est congelée et décongelée 3 fois, comme ci-dessus et éclaircie par centrifugation.

Préparation de l'antigène S

Une partie du surnageant limpide est adsorbée deux fois avec des érythrocytes de coq pour éliminer l'antigène libre. Ce liquide est alors utilisé comme antigène soluble pour fixation du complément.

2) Titrage de l'hémagglutinine

Des séries de dilutions de 2 en 2 sont faites en soluté physiologique dans des plaques à hémagglutination du type OMS, dilutions allant du 1/4 au 1/2048. A 0,4 ml de chacune de ces dilutions on ajoute 0,4 ml de globules rouges de poule 0,5 %, puis on laisse sédimenter à la tempé-

rature du laboratoire pendant 60 mn. Le résultat est lu par comparaison avec la sédimention des globules dans les cupules de contrôle. L'unité hémagglutinante est définie comme la dernière dilution qui donne une hémagglutination nette.

3) Titrage de l'antigène soluble pour fixation du complément

- Préparation du sérum anti S.

Le sérum spécifique anti-antigène soluble est préparé suivant la technique Lief et Henle, (1959).

Méthode de préparation de l'hémolysine et du complément :

Le sérum hémolytique anti-mouton et le complément lyophilisé du cobaye distribués commercialement par l'Institut Pasteur ont été utilisés tout au cours de notre expérimentation. L'hémolysine correspondante a un titre élevé et donne toujours des résultats satisfaisants. Le complément est titré en utilisant comme diluant un tampon barbital contenant les ions Ca^{++}.

Le titrage du complément s'effectue comme suit :

Tableau 2 :

C'.....	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,2	0,22	0,24	0,26	0,28	0,03
Diluant	0,32	0,30	0,28	0,26	0,24	0,22	o,2	0,18	0,16	0,14	0,12	0,10	0,4
	Bain-marie à 37°C pendant 1 heure.											
G.R. mouton 2 % 0,1 Sérum hémolytique 3 U	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
0,1	Bain-marie à 37°C pendant 30 minutes.											

La dilution la plus élevée de complément qui donne une hémolyse 100 % est considérée comme une unité. On ajoute 2 unités de complément dans la réaction.

4) Titrage de l'antigène S par fixation du complément

Le titre de l'antigène est déterminé par titrage en échiquier suivant la méthode de Lin et coll., (1964). Des séries de dilution de 2 en 2 de sérum sont faits en tube de Kahn, de 1/4 à 1/256. Des dilutions semblables d'antigène, recueilli comme nous l'avons vu plus haut à des temps différents sont faites dans une autre série de tubes de Kahn, de 1/1 à 1/128. Dans les plaques à cupules on ajoute une goutte (0,025 ml) de dilution d'antigène, une goutte de chaque dilution de sérum et une goutte de complément contenant deux unités. L'ensemble est conservé pendant la nuit à + 4°C. Le lendemain matin le mélange est réchauffé à 37°C pendant 15 mn avant que l'on ajoute les globules rouges sensibilisés (ceux-ci contiennent par parties égales des érythrocytes de mouton à 2 % et de l'hémolysine anti-mouton à 2 unités).

Le mélange final est mis à 37°C pendant 15 mn. La plus forte dilution d'antigène qui donne +++ avec 4unités de sérum est considérée comme une unité antigène. Dans tous les cas on inclus dans la réaction des témoins avec 100, 75 et 50 % de complément

5) Titrage infectieux

Souche virale : AE 2/Alfort

Cultures cellules : cellules RS, RV et RM.

Procédé : il reste le même pour toutes les cultures cellulaires.

Des dilutions en séries de 10 sont effectuées avec du Hanks, de 10^{-1} à 10^{-7}. Partant de 10^{-3} on inocule 0,1 ml de chaque dilution de virus à 5 tubes de cultures cellulaires. La première dilution (10^{-1}) est inoculée à 4 tubes qui servent de témoins-virus. 4 tubes de cultures cellulaires non inoculés constituent les témoins-cellules. L'ECP est observé au grossis-

sement 4 x 10, après 48, 72 et 96 heures d'incubation à 35° C. La dose efficace 50 % a été calculée selon la méthode de Lepine et Maurin, 1964.

6) Titre hémadsorbant (HAd)

Les procédés de dilution de virus et d'inoculation des tubes de cultures cellulaires sont les mêmes que dans le cas précédent.

Après 72 heures d'incubation à 35°C les tubes inoculés avec le virus et les tubes témoins-cellules sont lavés 2 fois, avec du soluté physiologique, et l'on ajoute 1 ml environ d'une suspension à 0,5 % d'érythrocytes de coq. On laisse en contact à 4°C pendant 30 mn. Après quoi les tubes sont de nouveau lavés au soluté physiologique et examinés au microscope au grossissement 4 x 10. Le titre hémadsorbant 50 % est ensuite calculé suivant la méthode Lepine et Maurin, (1964).

7) Apparition de l'hémadsorption

30 tubes de chaque culture cellulaire sont inoculés avec 200 DHAd 50 de virus et incubés à 35°C, en même temps que quelques tubes témoins non inoculés. Toutes les heures jusqu'à 5 heures on retire 5 tubes inoculés et des tubes témoins. Ces tubes sont lavés 3 fois avec du soluté physiologique; on ajoute 1 ml de suspension à 0,5 % d'érythrocytes de coq et on laisse à + 4°C pendant 30 mn. Puis les tubes sont lavés 2 fois dans du soluté physiologique et on procéde à la lecture au microscope au faible grossissement. Le pourcentage de cellules montrant une hémadsorption est estimé de façon arbitraire.

REACTIONS SEROLOGIQUES

1- a) - Epreuve de séroneutralisation (SN)

Souche virale : AE 2/Alfort.

Cultures cellulaires : RS, RV et RM.

Sérum immun : Il est préparé par immunisation de lapin au moyen d'injections de liquide allantoïque infectieux, pur, à raison de 5 ml

par voie intraveineuse et 5 ml par voie intrapéritonéale le premier jour; après quoi on administre à l'animal 3 doses du même virus à intervalles d'une semaine. Les animaux sont saignés une semain après la dernière injection. Leur sérum est chauffé à 56°C pendant 30 mn et conservé à - 20°C.

Exécution de la réaction

Les anticorps neutralisant la souche AE2/Alfort ont été titrés sur les systèmes cellulaires ci-dessus. Chaque sérum est dilué de 1/64 à 1/1024 (voir résultats). Chaque dilution est mélangée à un volume égal de virus renfermant 200 DICT 50 dans 0,1 ml. Le mélange virus-sérum est incubé à 37°C pendant 1 heure, après quoi on inocule pour chaque dilution 5 tubes de cultures cellulaires à raison de 0,1 ml de mélange par tube, auquel on ajoute 1 ml de milieu d'entretien. Dans chaque cas on a ajouté:

- 4 tubes témoins de virus,
- 4 tubes témoins de cellules,
- et 4 tubes témoins de sérum.

On procède à la lecture de l'épreuve après 72 et 96 heures, lorsque les témoins-virus montrent des signes de destruction cellulaire. Le titre neutralisant du sérum s'exprime par la plus haute dilution de ce sérum qui neutralise l'effet cytopathogène (ECP).

b) Epreuve de neutralisation de l'hémadsorption

Le processus est le même que pour la séroneutralisation à l'exception des modification suivantes:

Après une durée d'incubation de 72 à 96 heures, les tubes de cultures sont lavés 2 fois dans du soluté physiologique et l'on y ajoute, ainsi que dans les témoins, 1 ml d'une suspension à 0,5 % d'érythrocytes de poulet que l'on laisse en contact avec les cellules à 4°C pendant 30 mn. Après quoi les tubes sont lavés 2 fois avec du soluté physiolo-

gique et l'on examine au microscope. Le titre du sérum s'exprime par la dilution initiale la plus élevée qui prévient l'hémadsorption.

2) Inhibition de l'hémagglutination (IHA) et réaction d'IHA croisées

Souches virales. Ce sont les souches mentionnées dans le Tableau 1.

Cultures cellulaires : rein de singe, rein embryonnaire de cheval, fibloblastes d'embryon de poulet, rein de mouton, souches Vero.

Antigène . Il est préparé sur embryon de poulet et sur cultures cellulaires.

Préparation de l'antigène sur embryon de poulet. Le liquide allantoïque infecté est centrifugé dans une centrifugeuse réfrigérée à 1 500 tr/mn pendant 10 mn. Le liquide surnagenant limpide est recueilli et traité avec un volume égal d'éther puis placé dans un réfrigérateur à 4°C pendant 30 mn. Après quoi le matériel viral traité par l'éther est utilisé comme antigène pour l'IHA.

Préparation d'antigène en cultures cellulaires. Toutes les cultures cellulaires que nous avons décrites jusqu'ici sont inoculées suivant les techniques mentionnées plus haut. Après un délai de 72 à 96 heures, lorsque les cellules sont détruites, le surnageant contenant les débrits cellulaires est congelé et décongelé 3 fois puis centrifugé pour éliminer les grosses particules. Le surnageant limpide est utilisé comme antigène.

Immunsérum. Il est préparé sur lapin, comme décrit plus haut. Les sérum inactivés sont traités par une suspension à 25 % de kaolin puis par une suspension d'érythrocytes de poulet pour éliminer l'inhibition et l'hémagglutination non spécifique.

Dans quelques cas le titre inhibant l'hémagglutination a aussi été recherché dans les sérums de cheval vaccinés antérieurement avec le vaccin

commercial.

Exécution de la réaction

Des dilutions de 2 en 2 des sérums sont mélangés à 4 unités (U) hémagglutinantes de virus. Le mélange est incubé à la température ordinaire pendant 60 mn et après addition d'un volume égal d'une suspension à 0,5 % d'érythrocytes de poulet. Laisser encore une heure à la température du laboratoire. On lit les résultats en fonction du témoin des globules rouges. L'inverse de la dilution finale la plus élevée du sérum qui donne une complète inhibition de l'hémagglutination est prise pour titre inhibant l'hémagglutination.

3) Fixation du complément (FC) et réactions croisées utilisant les antigènes

- Souches de virus :

  - AE 2/Alfort
  - AE 2/Miami
  - A 2/Hong Kong
  - B/England

- Antigène :

On le prépare à partir de la membrane chorio-allantoïque infectée comme nous l'avons déjà décrit, à ceci près que les membranes sont ici récoltées 48 heures après l'infection.

La technique de préparation du sérum anti S, du complément et du sérum hémolytique anti-globules rouges de mouton demeure la même que celle décrite plus haut. Dans un cas nous avons aussi titré ces antigènes vis-à-vis d'un sérum humain de convalescent.

Exécution de la réaction

Le titrage de l'antigène est fait comme dans les cas précédents avec le sérum anti S ainsi qu'avec du sérum de convalescent humain.

Pour titrer le sérum on fait des séries de dilutions de 2 en 2 en partant de 1/8 à 1/256 en tampon barbital, dans des tubes de Kahn. Chaque sérum est titré vis-à-vis de chaque antigène par la méthode de fixation du complément à la micro-goutte introduite par Lin et coll. en 1964; on utilise de 2 à 4 U d'antigène et 2 U de complément. La dilution avec laquelle plus de 75 % des globules rouges restent non hémolysés est prise comme titre fixant le complément de ce sérum.

4) Immunodiffusion (ID)

Sérums : Les sérums anti AE 1/Prague et AE 2/Alfort sont préparés suivant la description ci-dessus. On utilise quelques échantillons de sérum de chevaux vaccinés par le vaccin commercial anti-grippe du cheval contre les souches AE 1/Prague, AE 2/Alfort, AE 2/Miami et PR8. Les sérums des chevaux sont prélevés à des intervalles de 2 semaines; pendant 22 semaines, après la première et la deuxième dose de vaccin. Cette dernière a lieu 12 semaines après la première. Pour cette épreuve les sérums ne sont pas inactivés.

Antigène

On utilise du virus grippal souche AE 1/Prague, AE 2/Alfort, dégradé par le desoxycholate de sodium (DOC) (Styke et coll., 1970).

Le virus contenu dans le liquide allantoïque est purifié par 2 cycles d'adsorption-élution sur érythrocytes de poulet, suivis de centrifugation différentielle à 30 000 tr/mn pendant 3 heures. Le culot viral est remis en suspension dans du soluté physiologique à la concentration d'environ 1 % en volume, puis désintégré par addition de DOC à

1 % (1 partie de DOC + 9 parties de virus purifié), enfin incubé à la température du laboratoire pendant 10 à 20 minutes. Avant d'ajouter le DOC le titre de la suspension hémagglutinante déterminée en plaques à cupules type OMS, atteignait 32 768 à 131 072 U/ml.

Exécution de la réaction

Nous suivons la technique de microdiffusion décrite par Wadsworth (1959) avec de légères modifications. L'agarose utilisée provenait de l'Industrie Biologique Française, S.A. Nous l'avons employée à la concentration de 0,9 % mélangée avec du tampon Prince qui à la composition suivante :

- NaCl : 0,1M (x2) 11,6 g
- Tris : 0,001M (pH 7,6 à 25°C) 2,42 g
- EDTA : 0,001 M (292,25 x 2) 0,584 g
- Eau distillée : 1 000 ml.

Le pH est de 7,2. Comme conservateur on ajoute 0,1 % azide de sodium ou du merthiolate à 1/10 0000. Les lignes de précipitation apparaissent après 20 à 24 heures mais on laisse généralement l'immuno-diffusion se poursuivre pendant 6 jours. Après avoir lavé les préparation au soluté physiologique puis à l'eau distillée, les lignes de précipitation sont colorées avec le colorant ci-dessous et décolorées 3 fois avec une solution d'acide acétique.

Colorants :

- Amido Schwartz : 3/1 000
- Acétate de sodium : 6,8 g
- CH_3COOH : 100 ml
- Eau distillée : 1 000 ml.

5) Immunofluorescence

Souches virales :

- AE 1/Prague
- AE 2/Alfort

Cultures cellulaires :

RV, RM, RS. Les cellules sont cultivées en tubes à lamelle comme décrit précédemment.

Infection des cellules

Le liquide allantoïque contenant le virus est dilué dans le milieu d'entretien aux dilutions suivantes : pure, 10^{-1}, 10^{-2} et 10^{-3}. après avoir retirés des tubes à lamelles (18 x 9 mm) le milieu de croissance, on introduit dans chaque tube, à la pipette, 0,2 ml de chaque dilution de virus. Après 30 mn d'adsorption, on ajoute 1,8 ml de milieu. 4 tubes à lamelles sont utilisés pour chaque dilution à chaque intervalle d'incubation. Ceux-ci sont les suivants : 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20 et 24 heures après l'inoculation. Pour arrêter les cultures on lave énergiquement les lamelles avec du tampon phosphate à pH 7,2. On les sèche à température ordinaire et on les fixe suivant la méthode de Coons et Kaplan.

a) Méthode indirecte

- sérum pour immunofluorescence.

Les immuns sérums contre les souches virales sont préparés sur poules comme décrit plus haut. Avant l'utilisation, ces sérums sont adsorbés avec de la poudre d'embryon de poulet (Coons, 1958). Le titre IH des sérums était de 1/1280 et la dilution d'usage pour l'immunofluorescence de 1/20. Le même traitement a également été appliqué à du sérum normal de poulet.

Nous avons utilisé des immunoglobulines anti-poulet conjuguées avec

l'isothiocyanate de fluorescéine fournies par l'Institut Pasteur de Paris.

- Méthode de coloration

Les lamelles sont partagées en 3 portions avec un marqueur; une partie est recouverte par l'immun-sérum; une deuxième partie avec le sérum normal qui sert de témoin et la troisième partie laissée telle quelle comme témoin-cellules. On laisse réagir pendant 30 minutes à la température ordinaire puis on lave pendant 15 minutes dans du tampon phosphate à pH 7,2 et pendant 10 minutes dans l'eau distillée. Après quoi on recouvre les lamelles à l'exception de la partie qui sert de témoin-cellules avec des globulines anti-poulet marquées. Enfin, on lave de nouveau avec du tampon phosphate pendant 15 minutes et avec de l'eau distillée pendant 10 mn et on monte à l'elvanol.

b) Méthode directe

Sérum. Nous avons utilisé du sérum anti-AE 2/Alfort préparé sur lapins.

Conjugaison du sérum avec l'isothiocyanate de fluorescéine. La technique utilisée est celle décrite par Atanasiu (1964) avec quelques modifications. Le sérum est fractionné au moyen d'une solution saturée de sulfate d'ammonium à la température ordinaire. Le précipité obtenu est lavé une fois dans une solution de sulfate d'ammonium à 1/2 saturation. La fraction globulinique est alors dissoute dans de l'eau distillée, à raison de 1/3 du volume du sérum original. On le laisse ensuite pendant 2 jours dans le tampon phosphate pH 7,2 à + 4°C pour éliminer l'excès de sulfate d'ammonium. Le contenu en protéine de la globuline est vérifié au spectrophotomètre (Beckman) suivant la technique de Burett: nous avons trouvé 27,2 mg par ml.

La conjugaison des globulines ainsi obtenues avec l'isothiocyanate de fluorescéine a été effectuée par la technique du Service de la Rage de l'Institut Pasteur.

A la solution de gamma-globulines, amenée à pH 9,2 au moyen d'un tampon carbonate-bicarbonate 0,5 M, l'on ajoute de l'isothiocyanate de fluorescéine cristallisé (Baltimore Biological Laboratories) dans la proportion de 1 mg pour 60 mg de protéines. Ce mélange est maintenu à la température de + 4°C sous agitation continuelle. Après 12 heures, on passe le tout sur colonne de Sephadex G 25, colonne équilibrée préalablement avec du tampon phosphate; le colorant non conjugué est ainsi éliminé et le liquide effluent recueilli jusqu'à ce que la teneur en protéines ainsi que la teneur en fluorescéine devienne très faible.

La dilution d'usage du conjugué est de 1/10.

- Procédé de coloration.

Des lamelles fixées à différents intervalles sont divisées en 3 parties avec un marqueur; une partie est bloquée avec du sérum anti-AE 2/ Alfort dilué à 1/10; ceci sert de témoin négatif. Puis deux parties de la lamelle (incluant la portion bloquée) sont recouvertes de conjugué. Après 30 mn de contact à la température ordinaire, on lave pendant 15 mn avec du tampon phosphate puis pendant 15 autres minutes avec de l'eau distillée. La 3ème partie de la lamelle sert de témoin-cellule. Cependant chaque fois on a également coloré des cellules témoins non inoculées. Finalement les lamelles sont montées sur lame de verre dans de l'elvanol.

Microscope à fluorescence

Les préparations décrites ci-dessus sont examinées en fluorescence au moyen d'un microscope Leitz équipé de filtres GB/2 et UG/1 et d'une lampe de 200 W à haute pression de vapeur de mercure, montée d'un support Leitz. Des photographies sont prises sur des pellicules réoscope 400Å.

Histopathologie

Souches virales AE 1/Prague et AE 2/Alfort.

- Cultures cellulaires :

RS, RFC, RV, RM et cellules Vero.

- Inoculation des cellules

Après avoir éliminé le milieu de croissance des tubes à lamelle, et avoir lavé ceux-ci comme d'habitude, on introduit à la pipette 0,2 ml de liquide allantoïque contenant le virus dans chaque tube, puis on ajoute partout 1,8 ml de milieu d'entretien. Après 72 à 96 heures, ou bien lorsque on remarque des signes de destruction cellulaire, les lamelles sont fixées au Bouin alcoolique pendant 30 mn, passées dans l'alcool à 80° pendant 10 mn, colorées à l'hémalun éosine et examinées au microscope à faible et fort grossissement.

RESULTATS

Multiplication du virus grippal en cultures cellulaires

Nous avons étudié l'adaptabilité et la propriété de multiplication des souches de virus AE 1/Prague, AE 2/Alfort, AE 2/Miami et AE 2/NY isolées et entretenues à l'Institut Pasteur par passages successifs sur oeuf embryonné, sur cellules RS, RFC, FEP RM, RV et Vero. Les résultats obtenus en cultures cellulaires sont résumés ci-dessous.

a) cellules RS : Aucune des 4 souches de virus grippal n'a pu subir de passages réguliers. La souche A 1/Equi perdait ses propriétés hémagglutinantes et hémadsorbantes ainsi que l'effet cytopathogène après 3 passages.

Cependant au 4ème passage quelques cellules montraient une certaine activité hémadsorbante et quelques signes d'effet cytopathogène. Le matériel du 4ème passage n'a pu révéler la présence de virus après inoculation à l'oeuf.

Les souches AE 2/Alfort et AE 2/Miami n'ont pu subir plus de 4 passages. Le matériel du 4ème passage sur cellules réinoculé à l'oeuf embryonné et repassé à nouveau sur cellules (3 passages) avait perdu ses activités hémagglutinantes, hémadsorbantes et son effet cytopathogène.

En revanche la souche AE 2/NY a pu conserver des activités jusqu'à 8 passages successifs, quoique le titre hémagglutinant du virus soit très bas. Ce matériel, après retour à l'oeuf embryonné, perd son infectivité immédiatement après 3 passages successifs dans ce système cellulaire.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 1.

TABLEAU 1 : MULTIPLICATION DES VIRUS DE LA GRIPPE DU CHEVAL SUR CELLULES DE REIN DE SINGE

ıe de ˈus		Inverse de la dilution de virus											
			Nombre de passages sur cellules										
		Original	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ˈrague	HA	1.024	128	64	8	-	-	-						
	HAd		+	+	+	+	-	-						
	ECP		+	+	+	+	-							
			Le matériel du 4ème passage inoculé sur oeuf donne : HA 0											
lfort	HA	1.024	128	64	8	4	-							
	HAd		+	+	+	+	-							
	ECP		+	+	+	+	-							
			Le virus du 4ème passage inoculé sur oeuf donne HA : 1.024											
	HA	1.024					128	32	8	-	-	-		
	HAd						+	+	+	+	-	-		
	ECP						+	+	+	+	-	-		
			Le virus du 9ème passage inoculé sur oeuf donne HA 0.											
ſew York	HA	1.024	32	<16	<32	16	<16	<32	<8	<8	-			
	HAd		+	+	+	+	+	+	+	+	-			
	ECP		+	+	+	+	+	+	+	+	-			
			Le virus du 8ème passage inoculé sur oeuf donne HA : 1.024											
	HA	1.024									64	16	<4	-
	HAd										+	+	+	-
	ECP										+	+	+	-
Miami	HA	1.024	16	<32	16	8	-	-						
	HAd		+	+	+	+	-	-						
	ECP		+	+	+	+	-	-						

b) Cellules de rein de foetus de cheval. Les souches de virus grippal essayées dans ce système cellulaire sont les suivantes : AE 1/Prague, AE 2/Alfort et AE 2/NY. Après inoculation d'une forte dose de virus (environ 10^6 DICT 50), dans tous les cas, les signes de destruction cellulaire étaient visibles après 36 heures; les cellules hémadsorbaient et l'on pouvait observer un titre hémagglutinant de 1/128. Cependant, au cours du second passage l'effet cytopathogène, l'hémadsorption et la production d'hémagglutinine disparaissaient et même après 2 passages aveugles, la présence du virus ne pouvait plus être décelée dans ce système cellulaire. Le matériel viral de cultures cellulaires du 1er passage après retour à l'embryon de poulet dans l'oeuf, récupérait son titre original hémagglutinant de 1/1024 malgré cependant la perte du pouvoir infectant pour ces cellules au-delà du 1er passage. Les résultats sont présentés dans le tableau 2.

TABLEAU 2 : MULTIPLICATION DES VIRUS DE LA GRIPPE DU CHEVAL SUR CELLULES DE REIN DE FETUS DE CHEVAL

che de rus		Inverse de la dilution de virus				
		Original	Nombre de passages sur cellules			
			1	2	3	4
'Prague	HA	1.024	128	-	-	
	HAd		+	+	-	
	ECP		+	*	-	
			Le virus du premier passage inoculé sur oeuf donne : HA : 1.024, et est repassé sur cellules.			
	HA	1.024		128	-	-
	HAd			+	-	-
	ECP			+	*	-
'Alfort	HA	1.024	128	-	-	
	HAd		+	-	-	
	ECP		+	-	-	
			Le virus du premier passage inoculé sur oeuf donne : HA : 1.024, et est repassé sur cellules.			
	HA	1.024		128	-	
	HAd			+	-	
	ECP			+	-	
N.Y.	HA	1.024	128	-	-	
	HAd		+	-	-	
	ECP		+	-	-	
			Le virus du premier passage inoculé sur oeuf donne HA : 1,024, et est repassé sur cellules.			
	HA	1.024		128	-	
	HAd			+	-	
	ECP			+	-	

* Destruction non spécifique des cellules.

c) Cellules d'embryon de poulet.

Comme dans le cas des cellules rénales de cheval, les 3 souches de virus ont perdu leur propriété de se multiplier immédiatement après le 1er passage, et aucune adaptation ne survient, même après 2 passages aveugles supplémentaires. Les résultats obtenus sont présentés sur le tableau 3.

TABLEAU 3 : MULTIPLICATION DES VIRUS DE LA GRIPPE DU CHEVAL SUR CELLULES EMBRYONNAIRES DE POULET

Souches de virus		Inverse de la dilution de virus				
		Original	Nombre de passages sur cellules			
			1	2	3	4
AE_1/Prague	HA	1.024	128	-	-	
	HAd		+	-	-	
	ECP		+	+	-	
AE_2/Alfort	HA	1.024	8	-	-	
	HAd		+	-	-	
	ECP		+	-	-	
AE_2/N.Y.	HA		<16	-	-	
	HAd		+	-	-	
	CPE		+	-	-	

d) Cellules embryonnaires de mouton

Une souche de virus AE 1/Equi et 3 souches de virus AE 2/Equi ont été essayées sur ce système cellulaire. Les souches AE 1/Prague et AE 2/Alfort n'ont pu être passées que deux fois successives. Les premiers signes de la multiplication virale étaient l'hémadsorption que l'on pouvait constater en 12 heures. Ils étaient suivis de lésions de destruction cellulaire et de la production d'hémagglutinine libre, 40 à 48 heures après l'infection. La production d'hémagglutinine au second passage était très faible et l'adaptation n'a pu être réalisée même après 3 passages aveugles dans ce système cellulaire.

En revanche les souches AE 2/Miami et AE 2/NY ont supporté 3 à 5 passages successifs en manifestant toutes les activités virales telles que ECP, hémagglutination et hémadsorption. Dans ce cas l'hémadsorption a pu être observée 24 heures après l'infection alors même que l'ECP et l'hémagglutinine libre n'étaient décelables qu'à partir de 20 à 48 heures. Le titre hémagglutinant du virus libre est tombé soudainement au second passage sans pouvoir remonter. Là encore l'adaptation n'a pu être réalisée même après 2 passages ultérieurs à blanc. Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau 4.

TABLEAU 4 : MULTIPLICATION DES VIRUS DE LA GRIPPE DU CHEVAL SUR CELLULES DE REIN DE MOUTON

ouches de virus		Inverse de la dilution de virus							
		Original	Nombre de passages sur cellules						
			1	2	3	4	5	6	7
E_1/Prague	HA	1.024	128	<32	-	-	-		
	HAd		+	+	-	-	-		
	ECP		+	+	-	-	-		
E_2/Alfort	HA	1.024	128	16	-	-	-		
	HAd		+	+	-	-	-		
	ECP		+	+	-	-	-		
E_2/N.Y.	HA	1.024	128	16	16	16	16	-	-
	HAd		+	+	+	+	+	-	-
	ECP		+	+	+	+	+	-	-
E_2/Miami	HA	1.024	64	32	8	-	-		
	HAd		+	+	+	-	-		
	ECP		+	+	+	-	-		

e) Lignée cellulaire continue Vero

Aucune des trois souches de grippe équine AE 1/Prague, AE 2/Alfort et AE 1/NY n'a pu subir plus d'un passage sur lignées cellulaires et l'adaptation ne s'est pas produite, même après 3 passages aveugles.

Le matériel viral de culture cellulaire du 1er passage a été reporté sur embryon de poulet dans l'oeuf, a récupéré ainsi sa virulence originelle puis a été réinoculé à la lignée cellulaire. Cependant les résultats obtenus sont restés négatifs, dès le 1er passage comme dans le cas précédent. On trouvera les résultats de cette expérience dans le tableau 5.

f) Cellules de rein de veau embryonnaire (RV)

Des 4 souches de virus de grippe du cheval essayées en cultures cellulaires, la souche AE 1/Prague a perdu son pouvoir pathogène après un seul passage et même après 4 passages aveugles ultérieurs l'adaptation n'a pu se faire. Cependant la souche AE 2/NY a pu subir 4 passages. Quoique le titre hémagglutinant de ce virus soit très bas après le second passage, il pouvait encore manifester des activités virales telles que l'hémagglutination et l'ECP comme dans les premiers cas.

Les deux autres souches de virus : AE 2/Alfort et AE 2/Miami, se sont immédiatement adaptées à ce système cellulaire après 3 ou 4 passages successifs. Après une chute du titre hémagglutinant du virus au second passage, celui-ci est remonté immédiatement à 1/128 au 5ème passage et s'est stabilisé à 1/64. Les deux souches ont montré régulièrement une hémagglutination 24 heures après l'infection et l'ECP ainsi que la présence d'hémagglutinine libre étaient mis en évidence de 40 à 48 heures après l'infection. Au cours de ces passages, le caractère de ces souches n'a pas changé de façon marquée, seul le titre hémagglutinant a été constamment plus bas que celui de la série allantoïdienne de ces souches. Les résultats sont portés sur le tableau 6 et la figure 1.

TABLEAU 2 : MULTIPLICATION DES VIRUS DE LA GRIPPE DU CHEVAL SUR CELLULES DE REIN DE FETUS DE CHEVAL

de		Inverse de la dilution de virus				
		Original	Nombre de passages sur cellules			
			1	2	3	4
ague	HA	1.024	128	-	-	
	HAd		+	+	-	
	ECP		+	*	-	
			Le virus du premier passage inoculé sur oeuf donne : HA : 1.024, et est repassé sur cellules.			
	HA	1.024		128	-	-
	HAd			+	-	-
	ECP			+	*	-
ort	HA	1.024	128	-	-	
	HAd		+	-	-	
	ECP		+	-	-	
			Le virus du premier passage inoculé sur oeuf donne : HA : 1.024, et est repassé sur cellules.			
	HA	1.024		128	-	
	HAd			+	-	
	ECP			+	-	
.	HA	1.024	128	-	-	
	HAd		+	-	-	
	ECP		+	-	-	
			Le virus du premier passage inoculé sur oeuf donne HA : 1,024, et est repassé sur cellules.			
	HA	1.024		128	-	
	HAd			+	-	
	ECP			+	-	

* Destruction non spécifique des cellules.

c) Cellules d'embryon de poulet.

Comme dans le cas des cellules rénales de cheval, les 3 souches de virus ont perdu leur propriété de se multiplier immédiatement après le 1er passage, et aucune adaptation ne survient, même après 2 passages aveugles supplémentaires. Les résultats obtenus sont présentés sur le tableau 3.

TABLEAU 3 : MULTIPLICATION DES VIRUS DE LA GRIPPE DU CHEVAL SUR CELLULES EMBRYONNAIRES DE POULET

Souches de virus		Inverse de la dilution de virus				
		Original	Nombre de passages sur cellules			
			1	2	3	4
AE_1/Prague	HA	1.024	128	-	-	
	HAd		+	-	-	
	ECP		+	+	-	
AE_2/Alfort	HA	1.024	8	-	-	
	HAd		+	-	-	
	ECP		+	-	-	
AE_2/N.Y.	HA		<16	-	-	
	HAd		+	-	-	
	CPE		+	-	-	

d) Cellules embryonnaires de mouton

Une souche de virus AE 1/Equi et 3 souches de virus AE 2/Equi ont été essayées sur ce systéme cellulaire. Les souches AE 1/Prague et AE 2/Alfort n'ont pu être passées que deux fois successives. Les premiers signes de la multiplication virale étaient l'hémadsorption que l'on pouvait constater en 12 heures. Ils étaient suivis de lésions de destruction cellulaire et de la production d'hémagglutinine libre, 40 à 48 heures après l'infection. La production d'hémagglutinine au second passage était très faible et l'adaptation n'a pu être réalisée même après 3 passages aveugles dans ce systène cellulaire.

En revanche les souches AE 2/Miami et AE 2/NY ont supporté 3 à 5 passages successifs en manifestant toutes les activités virales telles que ECP, hémagglutination et hémadsorption. Dans ce cas l'hémadsorption a pu être observée 24 heures après l'infection alors même que l'ECP et l'hémagglutinine libre n'étaient décelables qu'à partir de 20 à 48 heures. Le titre hémagglutinant du virus libre est tombé soudainement au second passage sans pouvoir remonter. Là encore l'adaptation n'a pu être réalisée même après 2 passages ultérieurs à blanc. Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau 4.

TABLEAU 4 : MULTIPLICATION DES VIRUS DE LA GRIPPE DU CHEVAL SUR CELLULES DE REIN DE MOUTON

uches de virus		Inverse de la dilution de virus							
		Original	Nombre de passages sur cellules						
			1	2	3	4	5	6	7
$_1$/Prague	HA	1.024	128	<32	-	-	-		
	HAd		+	+	-	-	-		
	ECP		+	+	-	-	-		
$_2$/Alfort	HA	1.024	128	16	-	-	-		
	HAd		+	+	-	-	-		
	ECP		+	+	-	-	-		
$_2$/N.Y.	HA	1.024	128	16	16	16	16	-	-
	HAd		+	+	+	+	+	-	-
	ECP		+	+	+	+	+	-	-
$_2$/Miami	HA	1.024	64	32	8	-	-		
	HAd		+	+	+	-	-		
	ECP		+	+	+	-	-		

e) Lignée cellulaire continue Vero

Aucune des trois souches de grippe équine AE 1/Prague, AE 2/Alfort et AE 1/NY n'a pu subir plus d'un passage sur lignées cellulaires et l'adaptation ne s'est pas produite, même après 3 passages aveugles.

Le matériel viral de culture cellulaire du 1er passage a été reporté sur embryon de poulet dans l'oeuf, a récupéré ainsi sa virulence originelle puis a été réinoculé à la lignée cellulaire. Cependant les résultats obtenus sont restés négatifs, dès le 1er passage comme dans le cas précédent. On trouvera les résultats de cette expérience dans le tableau 5.

f) Cellules de rein de veau embryonnaire (RV)

Des 4 souches de virus de grippe du cheval essayées en cultures cellulaires, la souche AE 1/Prague a perdu son pouvoir pathogène après un seul passage et même après 4 passages aveugles ultérieurs l'adaptation n'a pu se faire. Cependant la souche AE 2/NY a pu subir 4 passages. Quoique le titre hémagglutinant de ce virus soit très bas après le second passage, il pouvait encore manifester des activités virales telles que l'hémagglutination et l'ECP comme dans les premiers cas.

Les deux autres souches de virus : AE 2/Alfort et AE 2/Miami, se sont immédiatement adaptées à ce système cellulaire après 3 ou 4 passages successifs. Après une chute du titre hémagglutinant du virus au second passage, celui-ci est remonté immédiatement à 1/128 au 5ème passage et s'est stabilisé à 1/64. Les deux souches ont montré régulièrement une hémagglutination 24 heures après l'infection et l'ECP ainsi que la présence d'hémagglutinine libre étaient mis en évidence de 40 à 48 heures après l'infection. Au cours de ces passages, le caractère de ces souches n'a pas changé de façon marquée, seul le titre hémagglutinant a été constamment plus bas que celui de la série allantoïdienne de ces souches. Les résultats sont portés sur le tableau 6 et la figure 1.

TABLEAU 5 : MULTIPLICATION DES VIRUS DE LA GRIPPE DU CHEVAL SUR CELLULES VERO

hes de rus		Inverse de la dilution de virus					
			Nombre de passages sur cellules				
		Original	1	2	3	4	5
Prague	HA	1.024	128	-	-		
	HAd		+	-	-		
	ECP		+	-	-		
			Le virus du premier passage inoculé sur oeuf donne HA : 1.024, et est repassé sur cellules.				
	HA	1.024		256	-		
	HAd			+	-		
	ECP			+	-		
Alfort	HA	1.024	128	-	-		
	HAd		+	-	-		
	ECP		+	-	-		
			Le virus du premier passage inoculé sur oeuf donne HA : 1.024, et est repassé sur cellules.				
	HA	1.024		256	-		
	HAd			+	-		
	ECP			+	-		
N.Y.	HA	1.024	128	-	-		
	HAd		+	-	-		
	ECP		+	-	-		
			Le virus du premier passage inoculé sur oeuf donne HA : 1.024, et est repassé sur cellules.				
	HA	1.024		128	-		
	HAd			+	-		
	ECP			+	-		

TABLEAU 6 : MULTIPLICATION DES VIRUS DE LA GRIPPE DU CHEVAL SUR CELLULES DE REIN DE VEAU

ıches de virus			Inverse de la dilution de virus													
			Nombre de passages sur cellules													
		Original	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
/Prague	HA	1.024	256	-	-	-										
	HAd		+	-	-	-										
	ECP		+	-	-	-										
/Alfort	HA	1.024	128	32	32	32	128	64	64	64	64	64	64	64	64	64
	HAd		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ECP		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
/N.Y.	HA	1.024	128	16	16	8	-	-	-							
	HAd		+	+	+	+	+	-	-							
	ECP		+	+	+	+	+	-	-							
/Miami	HA	1.024	64	32	32	32	64	64	64	64	64	64				
	HAd		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
	ECP		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				

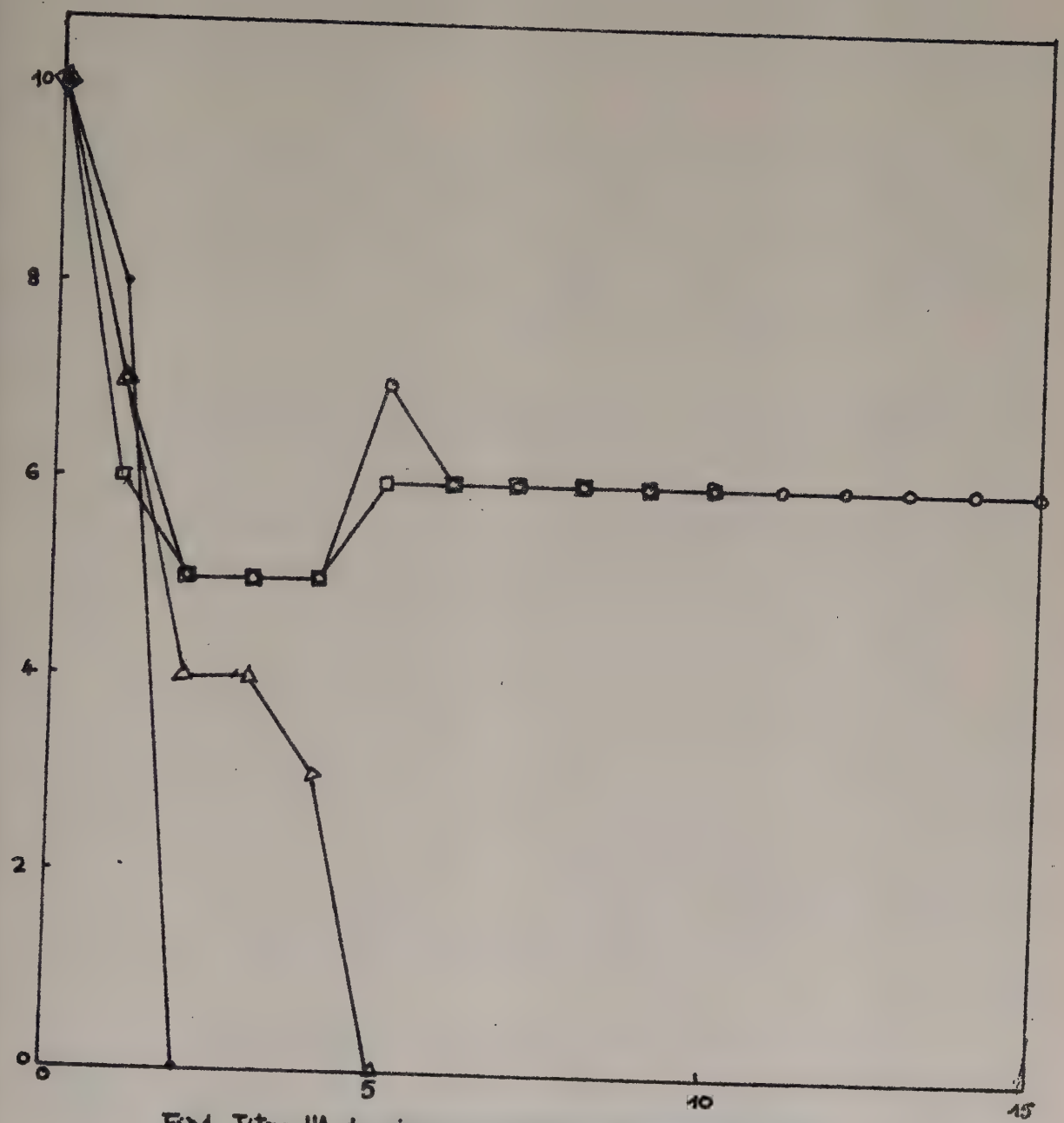


Fig 1. Titre HA du virus au cours des passages sur RV.
en abscisse: nombre de passages
en ordonnée: HA en valeur $\log_2$

o——o AE2/Alfort
□——□ AE2/Miami
●——● AE1/Prague
△——△ AE2/NY

La spécificité antigénique de ces virus a été vérifiée également par différents procédés sérologiques. La réaction d'hamagglutination (HA) due à ces virus était inhibée de façon spécifique par le sérum spécifique de souche à un titre de 1/640, aux passages n° 5, 8 et 15. Ceci est comparable avec ce que l'on obtient pour le virus allantoïdien.

Sur la figure 2 on note que l'antigène soluble intra-cellulaire préparé 24 heures après l'infection, à partir des souches AE 2/Alfort et AE 2/Miami pouvait aussi fixer le complément avec un sérum spécifique (sérum anti antigène S, préparé sur cobaye), quoique le titre d'antigène par ml soit plus bas que dans le matériel du 1er passage.

La présence d'antigène viral spécifique est également témoignée par la méthode de fluorescence, au niveau des passages 8 et 15 dans le cas de la souche AE 2/Alfort. Les résultats correspondant sont illustrés par les photographies 1 à 3. Au 8ème passage le premier signe de fluorescence spécifique a été observé dans les noyaux et tout autour d'eux,et ceci 8 heures après l'infection.

Dans l'une de ces préparations (photo 1) on a pu observer une fluorescence granuleuse intense et claire, localisée à l'intérieur du noyau, ainsi qu'une fluorescence distincte au niveau de la zone périnucléaire. L'autre photo représente la même préparation, mais colorée par la technique indirecte,montre une coloration périnucléaire intense et également quelques granulations fluorescentes à l'intérieur du noyau. Quant au cytoplasme il était presque entièrement négatif.

Au 15ème passage une fluorescence spécifique était décelée seulement après 12 heures. Dans l'une (photo 3) de ces préparations une fluorescence spécifique était localisée à la périphérie du noyau mais le cytoplasme était entièrement vide; alors que dans l'autre la fluorescence granuleuse était décelable dans le noyau pendant que le cytoplasme était fluorescent de façon diffuse.

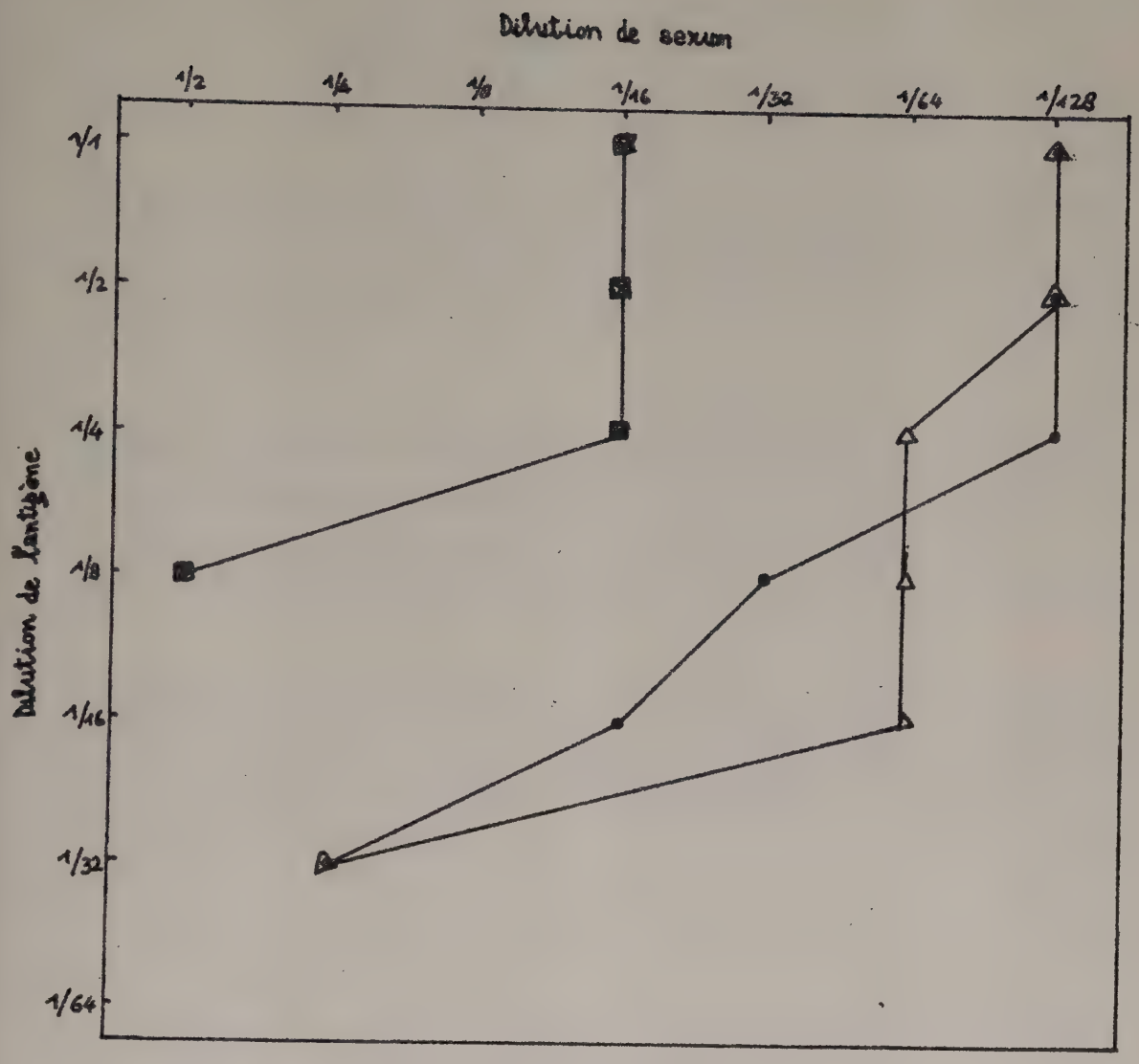


Fig 2. Titrage en échiquier de la production de l'antigène soluble (S) du virus AE2/Alfort et AE2/Miami à différent niveau de passage sur RV.

- AE2/Alfort premier passage
- AE2/Miami premier passage
- AE2/Alfort onzième passage
- AE2/Alfort quizième passage
- AE2/Miami dixième passage

LEGENDE DES PHOTOS

Photo 1. Cellules RV infectées avec 25 unités HA de virus AE 2/Alfort au huitième passage. 8 heures après l'infection. Technique directe. Fluorescence granuleuse dans le noyau et intense fluorescence périnucléaire.

Photo 2. Cellules RV infectées avec 25 unités HA de virus AE 2/Alfort au huitième passage. 8 heures parès l'infection. Technique directe. Fluorescence périnucléaire distincte et fluorescence granuleuse faible dans le noyau. Notez la projection filamenteuse des deux cellules.

Photo 3. Cellules RV infectées avec 25 unités HA de virus AE 2/Alfort au quinzième passage. 12 heures après l'infection. Technique directe. Fluorescence granuleuse dans la région périnucléaire et présence de fluorescence dans le noyau.

PRODUCTION DE L'HEMAGGLUTININE ET DE L'ANTIGENE SOLUBLE FIXANT LE COMPLEMENT (antigène S)

Une étude comparative du cycle de production de l'hémagglutinine et de l'antigène soluble S effectuée dans 3 systèmes cellulaires différents a montré des résultats intéressants.

Des résultats du tableau 7 et de la figure 3 on peut conclure que l'hémagglutinine "associée aux cellules" était mise en évidence dans l'embryon de poulet aussi bien qu'en cellules RV et RM, presque en même temps c'est-à-dire jusqu'à 12 heures. Après 12 heures, la production d'hémagglutinine intracellulaire passait à un stade stationnaire jusqu'à 24 heures. Après quoi s'est amorcé la phase de déclin. L'hémagglutinine "libre" dans le milieu de culture cellulaire commence à s'élever 5 heures après la première. On voit sur la courbe de croissance (fig. 3) que l'hémagglutinine libre continue à s'élever jusqu'à 20 heures et reste presque constante jusqu'à ce que les cellules dégénèrent.

Le titre de l'hémagglutinine libre était toujours plus bas sur cellules que pour le virus cultivé dans l'allantoïde.

D'autre part, il y avait quelques différences dans la mesure ou la production de l'antigène S est impliquée chez ses hôtes. Dans les cellules RV, RM et dans la MCA, l'antigène S "associé aux cellules" était décelable juste après 2 heures d'infection et augmentait rapidement jusqu'à 8 heures; après une phase stationnaire d'environ 8 heures le titre d'antigène S augmentait jusqu'à 24 heures.

Dans les cellules de rein de veau embryonnaire et de rein de mouton embryonnaire l'antigène S intracellulaire n'est apparu qu'après 3 et 4 heures respectivement; rapidement il a augmenté jusqu'à 12 heures pour rester presque constant jusqu'à 24 heures, au moment ou un effet cytopathogène distinct s'observait sur les préparations sans coloration. Les résultats sont présentés sur le tableau 8, figure 4.

TABLEAU 7 : PRODUCTION D'HEMAGGLUTININE SUR DIFFERENTES CELLULES
(MOYENNE DE 4 EXPERIENCES)

(Les titres sont exprimés par l'inverse de la dilution)

Heures	Cellules			M.C.A.
	Rein de Veau	Rein de mouton	HA libre	
2	-	-	64	-
3	64	64	8	8
4	256	128	2	64
6	NF*	NF	NF	512
8	1.024	1.024	16	512
12	2.048	1.024	16	1.024
16	2.048	2.048	64	1.024
20	2.048	2.048	128	1.024
24	2.048	2.048	128	1.024
28	256	128	128	256
32	64	64	128	256

(*) NF : n'a pas été fait.

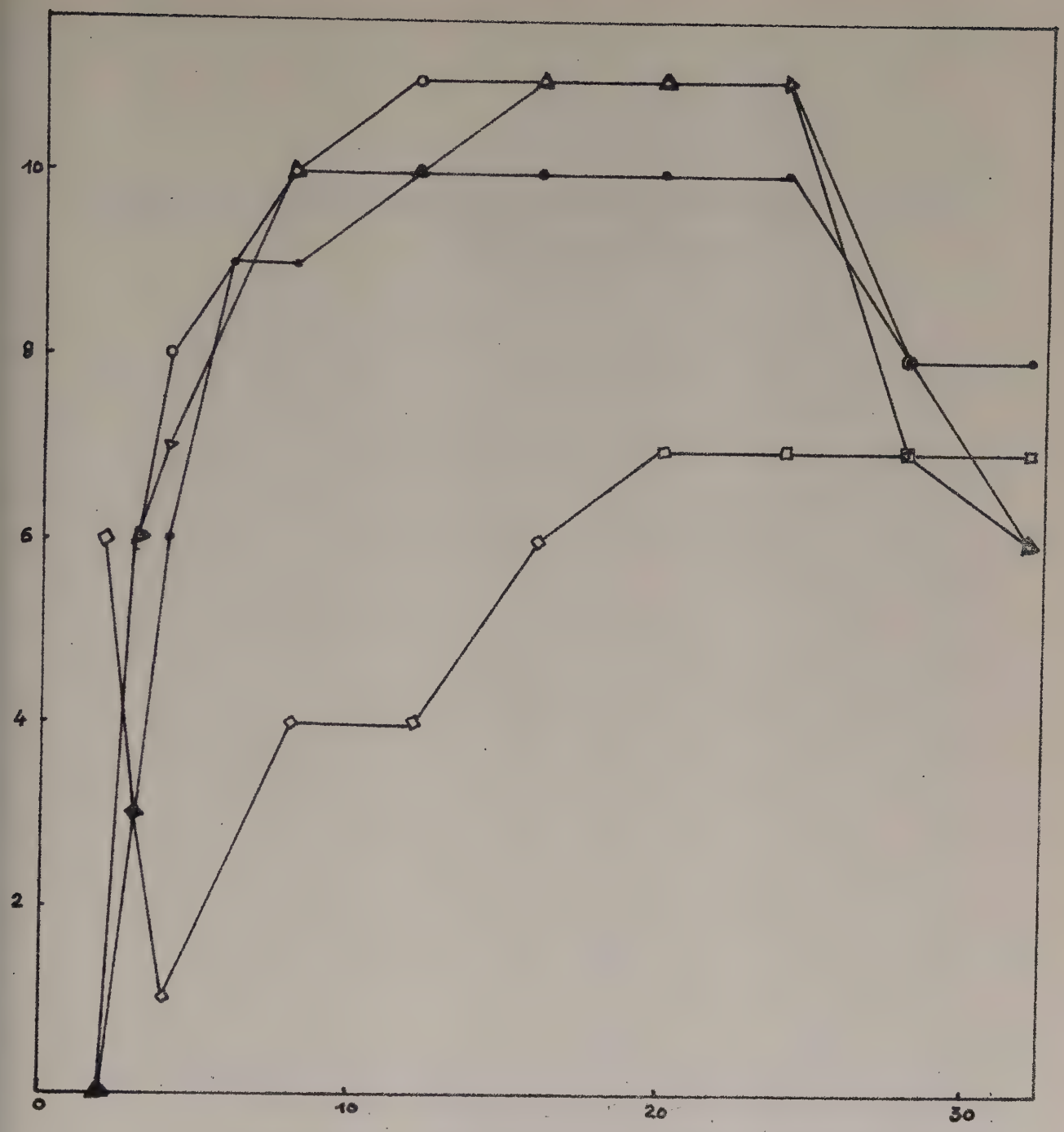


Fig 3. Production d'hémagglutinine sur différentes cellules.
en abscisse: le temps (en heures)
en ordonnée: l'hémagglutinine en valeur $\log_2$

- hemagglutinine sur RV
- hemagglutinine sur RM
- hemagglutinine sur MCA
- hemagglutinine libre

TABLEAU 8 : PRODUCTION D'ANTIGENE SOLUBLE (S) SUR DIFFERENTES CELLULES (MOYENNE DE 4 EXPERIENCES)

Heures	Nombre d'unités d'antigène par ml.		
	RV	RM	MCA
2	-	-	240
3	40	-	480
4	120	80	640
8	320	480	960
12	640	640	960
16	640	640	960
20	640	960	1280
24	960	960	1920

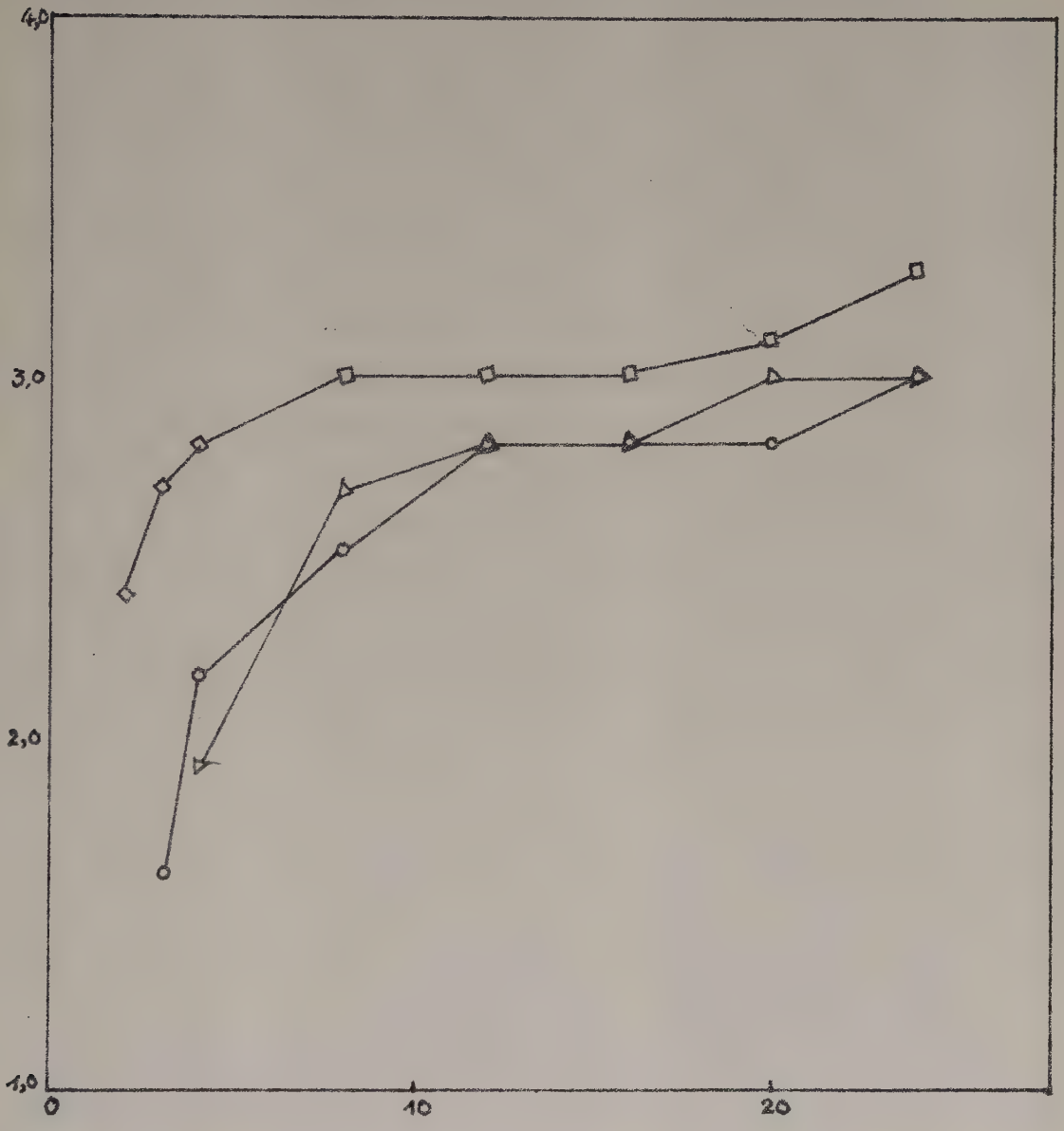


Fig 4. Production d'antigène S sur différentes cellules.
en abscisse: le temps (en heures)
en ordonnée: l'antigène S en unités fixant le complément par ml en valeur log 10

□——□ MCA
○——○ RV
△——△ RM

3) Production d'hémagglutinine sur différents types cellulaires

Les résultats de la production d'hémagglutinine libre sur différents systèmes cellulaires sont présentés sur le tableau 9. Des boîtes de Roux recouvertes d'un tapis cellulaire, contenant environ 2×10^7 cellules sont infectées avec du virus titrant 4 à 5 logarithmes en unités hémagglutinantes. Après 30 minutes de contact on lave deux fois les cellules avec le milieu de culture pour éliminer le virus libre, on introduit du milieu d'entretien (san sérum) et on incube à 35°C. L'hémagglutinine libre est décelée dans le milieu après environ 12 heures; elle atteint son maximum en 48 heures. Ceci s'observe pour chacune des 6 souches de virus essayées. Même après destruction complète des cellules, le titre hémagglutinant ne monte pas très haut. Le titre hémagglutinant obtenu dans le milieu sans cellule était comparable dans tous les systèmes cellulaires essayés, excepté dans quelques cas, tel que celui de la souche AE 2/Alfort en cellules embryonnaires de poulet et de la souche AE 2/NY en rein de foetus de cheval et en cellules embryonnaires de poulet; dans tous ces cas le titre était très faible.

D'un autre côté, l'hémagglutinine produite sur embryon de poulet inoculé avec du virus dilué à 10^{-3} ou 10^{-4} avait un titre comparable pour chacune des 6 souches de virus, à cette exception près que pour les souches B/England et AE 2/Hong Kong le titre hémagglutinant était inférieur d'une cupule. Dans tous les cas l'hémagglutinine libre produite en cultures cellulaires titre moins que celle du virus cultivé sur oeuf.(Tableau 9.).

4) Agglutination des érythrocytes de différentes espèces d'animaux

Les résultats d'essais de 6 souches de virus grippal pour recherche de l'agglutination des érythrcytes de différentes espèces de mammifères et d'oiseaux figurent sur le tableau 10.

LEAU 9 : COMPARAISON DE LA PRODUCTION D'HEMAGGLUTININE SUR DIFFERENTES CELLULES

(Les titres sont exprimés par l'inverse de la dilution)

hes de rus	E. Poulet	RS	RFC	RME	RVE	FE Poulet	Vero
'Prague	1.024	128	128	128	256	128	128
'Alfort	1.024	128	128	128	128	8	128
'N.Y.	1.024	128	4	128	NF	16	128
'Miami	1.024	64	NF	64	64	NF	NF
ngland	512	128	NF	NF	NF	NF	NF
H.K.	512	64	NF	NF	NF	NF	NF

NF : n'a pas été fait.

Le virus A1/Equi n'agglutine pas les globules rouges de singe rhésus, alors que le titre agglutinant était comparable dans le cas des érythrocytes des autres mammifères. La souche de virus B/England n'agglutine que les érythrocytes humaine O et ceux de cobaye.

Les souches AE 2/Alfort et AE 2/Miami agglutinent les érythrocytes de toutes les espèces animales (se référer au tableau 10). Quoique les résultats obtenus soient plus ou moins comparables dans les cas d'érythrocytes de poulets, humains de groupe O et de cobayes, le titre hémagglutiant pour les globules rouges de poulets restait invariable et constant dans tous les cas.(Tableau 10.).

5) Apparition d'hémadsorption en cultures cellulaires

On peut noter sur le tableau 11 que l'apparition d'hémadsorption dans le cas du virus AE 1/Prague était presque la même dans les trois systèmes cellulaires essayés dans l'expérience. Lorsque les tubes de 12 x 120 porteurs de cultures cellulaires étaient inoculés avec 50 à 100 unités hémagglutinantes de virus, l'hémadsorption était mise en évidence après 3 heures, visible au microscope au grossissement 10 x 4, et en 5 heures 100 % des cellules présentaient une hémadsorption.

6) Titrage du virus en cultures cellulaires par effet cytopathogène et hémadsorption

Les résultats présentés sur le tableau 12 indiquent que la souche AE 2/Alfort de virus grippal du cheval a des titres comparables, exprimés en doses cytopathogènes 50 % (DCP 50), effet cytopathogène net, et en doses hémadsorbantes 50 % (DHAd 50), dans les systèmes cellulaires suivants : rein de veau embryonnaire, rein de mouton embryonnaire et cellules de rein de singe; cependant le titre en DCP 50 aussi bien qu'en DHAd 50 était légèrement plus élevé en rein de mouton embryonnaire que dans les deux autres systèmes.

TABLEAU 10 : AGGLUTINATION DES GLOBULES ROUGES DE DIFFERENTES ESPECES D'ANIMAUX

(Les titres sont exprimés par l'inverse de la dilution)

Souches de virus	Poulet	Humain Groupe 0	Rhésus	Rat	Cobaye	Mouton
AE_1/Prague	1.024	256	-	512	512	512
AE_2/Alfort	1.024	512	< 256	512	1.024	512
AE_2/Miami	1.024	512	128	<64	512	256
B/England	512	128	-	-	1.024	-
A_2/H.K.	512	512	<4	64	<512	32

- = Pas d'agglutination

TABLEAU 11 : APPARITION DE L'HEMADSORPTION SUR DIFFERENTES CELLULES

Heures	Cellules			Remarques
	RS	RME	RVE	
0	-	-	-	négatif
2	-	-	-	négatif
3	+	+	+	environ 50%
4	++	++	++	environ 75%
5	+++	++	+++	environ 100%

TABLEAU 12 : TITRAGE DE VIRUS PAR ECP ET HAd SUR CULTURE DE CELLULES

Dilutions de virus	Nombre de tubes inoculés	Nombre de tubes détruits			Nombre de tubes présentant une HAd		
		RVE	RME	RS	RVE	RME	RS
10^{-3}	5	5	5	5	5	5	5
10^{-4}	5	5	5	5	5	5	5
10^{-5}	5	3	2	3	3	2	4
10^{-6}	5	1	0	1	1	0	1
10^{-7}	5	0	0	0	0	0	0
Témoin cellule	4	0	0	0	0	0	0
Témoin virus	4	4	4	4	4	4	4

7) Inhibition de l'hémagglutination et hémagglutination croisée

Pour les épreuves d'inhibition de l'hémagglutination et d'hémagglutination croisée, du virus traité à l'éther a été utilisé comme antigène. Après traitement à l'éther on a observé un doublement du titre hémagglutinant dû à la production d'hémagglutinine libre, excepté dans la souche B/England, laquelle est restée sans changement. Les valeurs comparées des titres hémagglutinants du virus traité et non traité se trouvent sur le tableau 13.

Le tableau 14 montre les résultats d'une épreuve d'inhibition croisée avec des immunsérums de poulets. On a pu noter que le titre du sérum en anticorps inhibant l'hémagglutination atteint toujours 1/1280 au moins en système homologue, alors qu'en système hétérologue ce titre est généralement inférieur à 1/40, excepté avec la souche AE 1/Prague où le titre inhibant décelé était inférieur à 1/80. Par ailleurs l'agglutination des globules rouges de poulet avec la souche B/England n'a pu être inhibée par aucun des 3 immunsérums hétérologues. De la même façon l'immunsérum anti B/England n'inhibe l'hémagglutinine en système hétérologue qu'à un titre négligeable, 1/20.

De cette observation résulte la notion qu'aucune des 4 souches de virus grippal impliquées dans cette expérience ne sont antigéniquement apparentées. Bien que, comme on l'a vu plus haut, les antigènes AE 1/Prague, AE 2/Alfort et A2/Hong Kong soient inhibés par les immunsérums hétérologues, le titre en anticorps inhibants décelé était presque négligeable, comparé au système antigène-anticorps homologue.

Dans le cas des antigènes AE 1/Prague et AE 2/Alfort préparés en différents systèmes cellulaires, le tableau 15 montre aussi une inhibition spécifique par l'immunsérum correspondant, les résultats obtenus étant comparables avec ceux du virus entretenu sur oeuf.

TABLEAU 13 : COMPARAISON DU TITRE HEMAGGLUTINANT DES VIRUS GRIPPAUX AVANT ET APRES TRAITEMENT A L'ETHER

(Les titres sont exprimés par l'inverse de la dilution)

Virus	Avant traitement	Après traitement
AE_1/Prague	1.024	2.048
AE_2/Alfort	1.024	2.048
AE_2/Miami	1.024	2.048
A2/Hong Kong	512	1.024
B/England	512	512

TABLEAU 14 : INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION ET INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION CROISEE ENTRE LES VIRUS GRIPPAUX HUMAINS ET EQUINS

(Les titres sont exprimés par l'inverse de la dilution)

Virus	Anti-Prague	Anti-Alfort	Anti-H.K.	Anti-B/Eng.
AE_1/Prague	1280	<40	<80	<20
AE_2/Alfort	<80	1280	40	<20
A2/H.K.	<40	40	2560	<20
B/England	-	-	-	2560

TABLEAU 15 : INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION AVEC LES ANTIGENES PREPARES EN CULTURES DE CELLULES

(Les titres sont exprimés par l'inverse de la dilution)

Virus	R. Veau	R. Mouton	R. Singe	Cellules Vero
AE_1/Prague	640	1,280	640	640
AE_2/Alfort	640	640	640	640

8) Fixation du complément et épreuves croisées correspondantes

Nous avons étudié de nouveau la spécificité de l'antigène soluble des souches de virus grippal AE 1/Prague, AE 2/Alfort, AE 2/Miami, A 2/Hong Kong et B/England préparé sur membrane chorioallantoïque d'embryon de poulet en incubation, vis-à-vis des sérums préparés contre l'antigène S provenant de la souche AE 2/Alfort. La technique utilisée était celle du titrage en échiquier. Sur la figure 5 on peut voir que tous les antigènes grippaux A fixent le complément avec les sérums anti-A pratiquement au même titre, alors que l'antigène grippal B ne donnait pas de fixation avec le sérum préparé contre les souches de type A. De même par la technique de titrage utilisant la dilution optimale du sérum, les 4 souches de type A de virus grippal fixaient le complément avec les sérums dérivés de la souche correspondante, mais pas les virus du type B. Les immunsérums contre l'antigène S étaient préparés sur cobaye. Les résultats sont présentés sur le tableau 16.

Dans un cas, un échantillon de sérum obtenu d'un convalescent humain suspect d'infection à virus grippal A 2/Hong Kong fixait le complément avec les souches de type A presque au même titre pour toutes, mais pas avec la souche de type B. Les résultats sont donnés dans le tableau 17.

Dans une autre série d'expériences, les antigènes S dérivés de membranes chorioallantoïques, de cellules RV et RM, ont été titrés par la méthode de l'échiquier : ils fixaient le complément avec l'immunsérum préparé sur cobaye contre l'antigène S, ainsi qu'avec le sérum d'un convalescent humain suspect d'infection à virus A 2/Hong Kong. On peut observer sur la figure 6 que les trois sources d'antigènes peuvent être également utiles pour l'usage de routine des réactions de fixation de complément au laboratoire. L'unité d'antigène soluble par ml dérivé de la souche AE 2/Alfort est comparable quelque soit le système cellulaire. Cependant le système de rein embryonnaire de mouton semble légèrement inférieur aux autres.

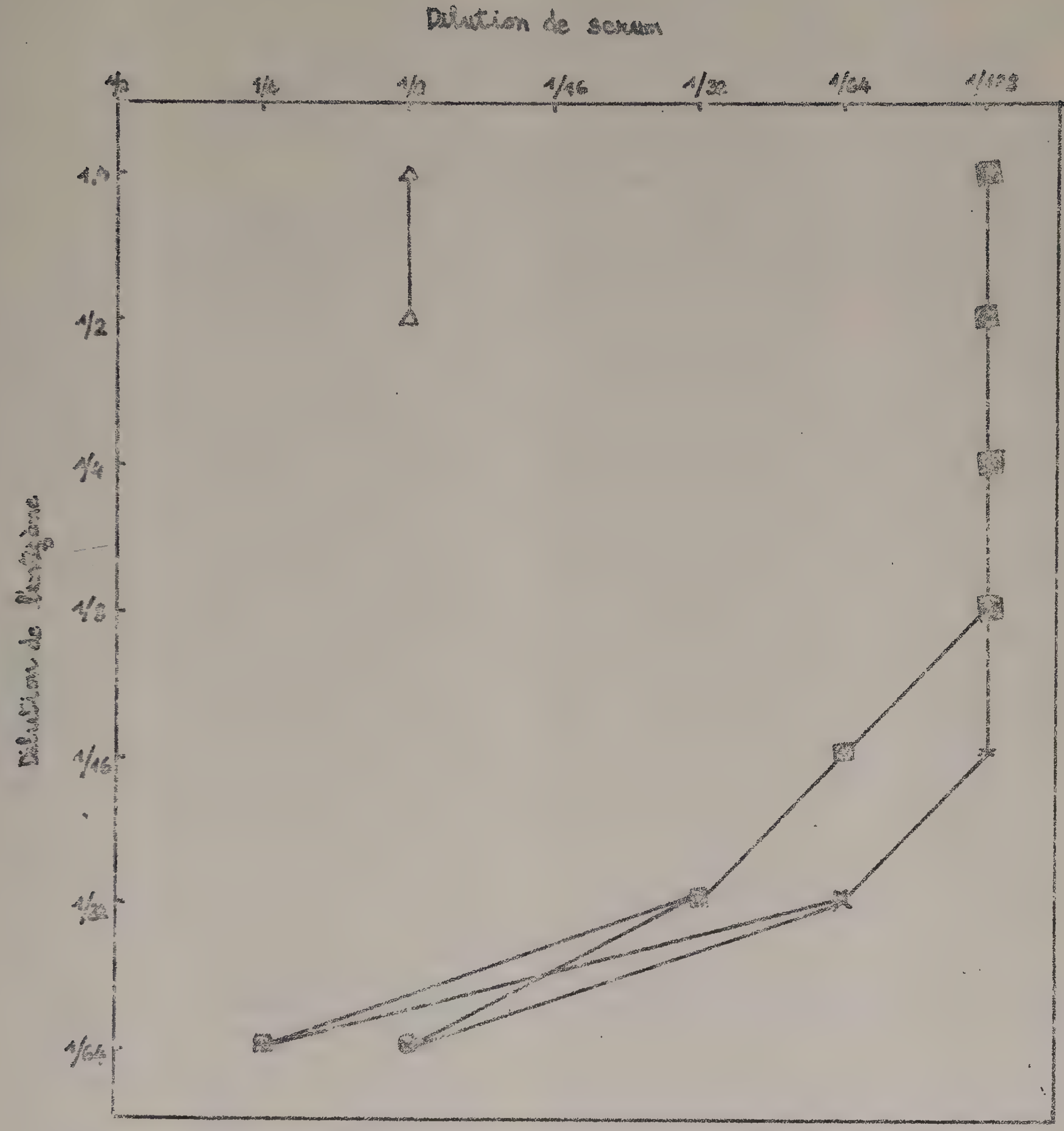


Fig.7. Titrage en échiquier de l'antigène S préparé sur MCA avec 4 souches de virus vis-à-vis d'un sérum anti S préparé chez le cobaye avec une souche de virus.

- o——o [illegible]
- x——x [illegible]
- o——o [illegible]
- ▫——▫ [illegible]
- △——△ B/England

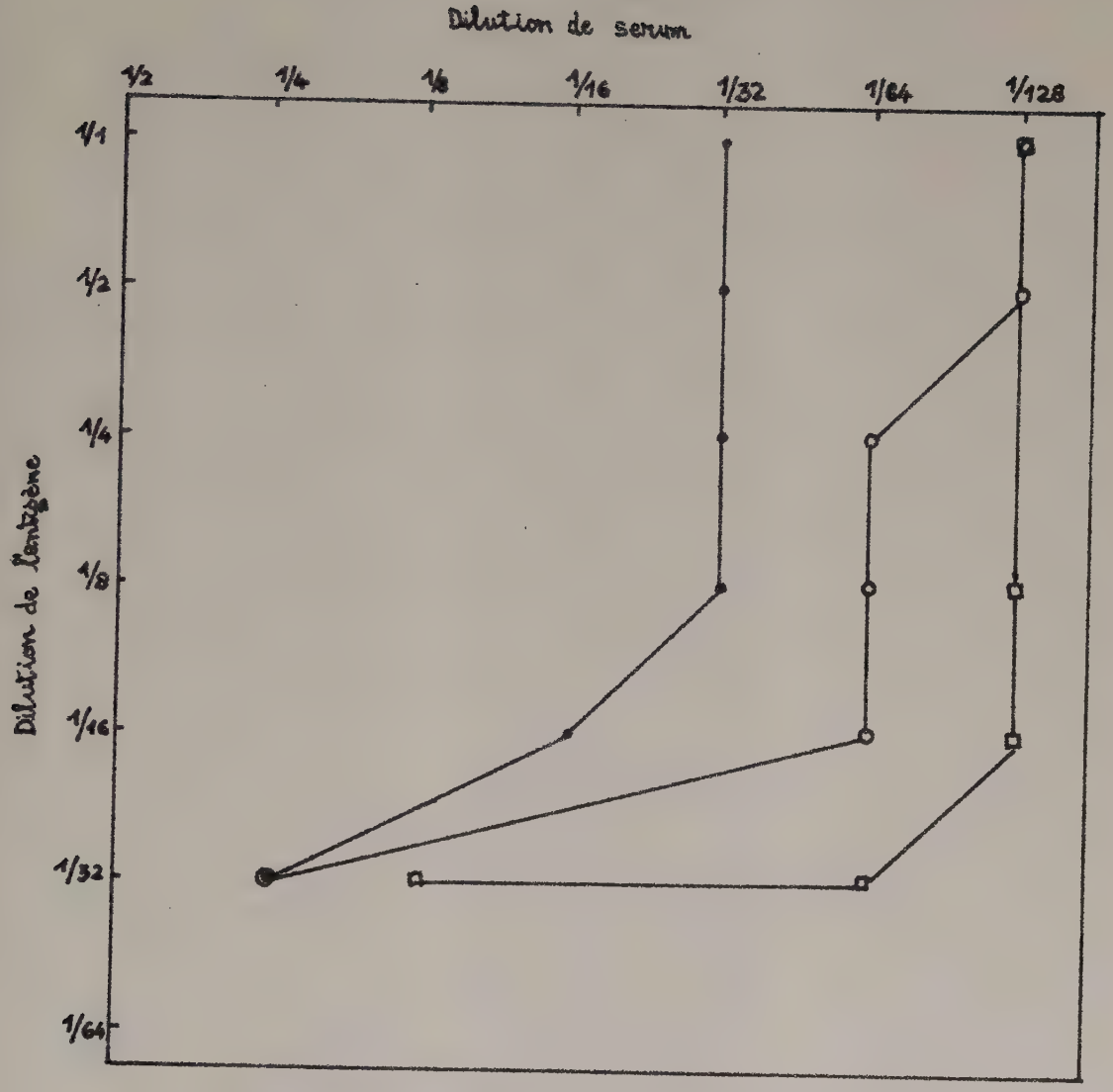


Fig 6. Titrage en échiquier de l'antigène soluble (S) produit sur des cellules différentes.

o—o cellules RV
•—• cellule RM
□—□ membrane chorioallantoïque

TABLEAU 16 : FIXATION DU COMPLEMENT AVEC LE SERUM ANTI S PREPARE SUR COBAYE AVEC L'ANTIGENE S ET 5 SOUCHES DIFFERENTES DE VIRUS GRIPPAL

		Antigènes				
		AE_1/Prague	AE_2/Alfort	AE_2/Miami	B/England	A2/Hong Kong
Sérum anti-S-Cobaye		1	2	3	4	5
1	1/4	4	4	4	3	4
2	1/8	4	4	4	0	4
3	1/16	4	4	4	0	4
4	1M32	4	4	4	0	4
5	1/64	4	4	3	0	4
6	1/128	3	3	0	0	0
7	1/256	0	3	0	0	0
8	N	0	0			
9	V	0	0			
10	C'	0	2	3	4	

4 = cent pour cent fixation
3 = 75 % fixation
2 = 50 % fixation
0 = pas de fixation

TABLEAU 17 : FIXATION DU COMPLEMENT AVEC LE SERUM HUMAIN DE CONVALESCENT ET L'ANTIGENE S DE 5 SOUCHES DIFFERENTES DE VIRUS GRIPPAL

		Antigènes				
		AE_1/Prague	AE_2/Alfort	AE_2/Miami	B/England	A2/Hong Kong
	Sérum humain de convalescent	1	2	3	4	5
1	1/8	4	4	4	2	4
2	1/16	4	4	4	0	4
3	1/32	4	4	4	0	4
4	1/64	4	4	4	0	4
5	1/128	2	4	4	0	+
6	1/256	+	4	4	0	+
7	1/512	0	0	0	0	0
8	N	-	-			
9	V	-	-			
10	C'	0	2	3	4	

4 = Cent pour cent fixation
3 = 75 % fixation
2 = 50 % fixation
0 = pas de fixation

9) IMMUNODIFFUSION

Immunodiffusion avec immunsérums

L'immunsérum préparé sur lapin, contre la souche AE 1/Prague et AE 2/Alfort de virus de grippe équine, donne de 2 à 4 lignes d'immunoprécipitation, vis-à-vis du virus désintégré par le déoxycholate, en système antigène-anticorps homologue (photo 1) et seulement 2 à 3 lignes en système antigène-anticorps hétérologue (photo 2).

Lorsque l'antigène d'un virus est mis à diffuser en présence de l'immunsérum correspondant, les lignes de précipitation peuvent approximativement être divisées en deux groupes. L'image du 1er groupe consistant en une ou des lignes confluentes encerclant le trou central contenant l'antigène, est probablement due au composant nucléoprotéinique (NP) du virus désintégré par le déoxycholate (DOC). Cet anneau de précipitation était présent dans tous les cas et constant en au moins une ligne avec superposition d'une ligne supplémentaire qui paraissait se différencier en d'autres lignes plus faibles dans quelques cas. L'anneau extérieur formé par la ligne de précipitation semblait très net et était probablement formé par le composant hémagglutiant du virus; il ne dépendait pas que de la présence des anticorps correspondants du sérum, mais aussi du rapport quantitatif dans l'immunodiffusion et de la souche de virus utilisée. On a vu que cette zone consiste en au moins 2 à 3 lignes (photos 3 et 4) plus, dans certains cas, une ligne superposée à l'une de ces trois lignes. L'image des lignes de diffusion obtenues en système antigène-anticorps homologue avec les deux virus était le même. Quand l'antigène est mis dans le trou central et les immunsérums anti A1/Equi et A2/Equi sont mis dans les trous périphériques suivant la description que l'on voit sur la figure, on peut noter que le premier groupe de lignes autour de l'orifice central constitue un anneau complet qui indique la complète identité antigénique des constituants nucléoprotéiniques des souches A1/Equi et A2/Equi; en revanche les lignes de précipitation de la région la plus externe qui ne formaient en aucun cas un anneau complet, et

ayant au moins une légère division à l'une des extrémités, pouvaient apparemment être produites par le constituant hémagglutinant de l'enveloppe virale (photos 3 et 4).

Les lignes de précipitation ne se forment pas en présence de sérums non immunisés, ni en présence de liquide allantoïque normal, ni avec de la suspension de membrane chorioallantoïque normale. Ceci témoigne de la spécificité de la réaction. Les lignes de précipitation qui se forment normalement en 4 à 6 heures, croissent en intensité et deviennent plus nettes avec le temps. A 10 - 12 heures on observe des lignes bien définies, facilement visibles. Le nombre des lignes n'est pas augmenté même si on laisse diffuser pendant une semaine l'antigène et l'anticorps.

Immunodiffusion avec du sérum de vacciné

Nous avons étudié la réponse en anticorps de 10 chevaux vaccinés avec du vaccin anti-grippe équine polyvalent provenant du commerce et contenant les souches AE 1/Prague, AE 2/Alfort, AE 2/Miami et PR/8, en examinant 6 échantillons de sérum d'animaux après vaccination, sérums recueillis à intervalle de 2 semaines après la première dose de vaccin, et 5 autres échantillons prélevés après la deuxième dose de rappel au bout de 12 semaines. La spécificité attribuée à ces sérums, en immunodiffusion avec du virus traité au désoxycholate de sodium (DOC) et leurs anticorps correspondants inhibant l'hémagglutination contre les souches AE 1/prague et AE 2/Alfort, sont présentés dans le tableau 18. Aucun anticorps ne pouvait être décelé par l'inhibition de l'hémagglutination ou par épreuve d'immunodiffusion contre l'une ou l'autre de ces deux souches de virus dans les sérums

des animaux non immunisés. Les sérums prélevés 2 semaines après la première dose de vaccin ne montraient généralement pas d'anticorps inhibant l'hémagglutination sauf chez le cheval n° 8 où un titre de 1/20 a pu être décelé contre la souche AE 1/Prague mais pas contre la souche AE 2/Alfort. De même les anticorps précipitants n'étaient pas décelables dans ce groupe de sérums sauf dans le cheval n° 2 (photo n° 7).

Lorsqu'on compare d'autres sérums prélevés après deux semaines le spectre en anticorps des sérums recueillis 4 semaines après l'immunisation est considérablement plus large; il révèle invariablement une élévation du titre des anticorps inhibant l'hémagglutination et des anticorps précipitants décelables dans l'épreuve d'immunodiffusion (photos 5 à 22). Dans ce groupe quelques sérums ont même montré deux lignes de précipitation distinctes (photos 7, 9, 11 et 13), et dans quelques cas une projection de ligne de diffusion du côté de la ligne de précipitation principale (photos 19 et 20).

Le niveau d'anticops révélé dans les sérums de la 4ème et de la 6ème semaine par inhibition de l'hémagglutination et par immunodiffusion était plus ou moins voisin sauf chez le cheval n° 9 où l'on pouvait observer une diminution remarquable du titre en anticorps inhibant l'hémagglutination et une négativité des anticorps précipitants contre le virus A1/Equi. A partir de la 6ème semaine le spectre en anticorps de ce sérum commençait rapidement à s'étrécir, dans la majorité des cas, et il semblaitne pas être influencé même par une dose de rappel de vaccin injecté après 12 semaines. Cependant dans quelques cas comme ceux des chevaux n° 1,,6 et 7 il y avait une ascension nette en anticorps révélée par les épreuves d'inhibition de l'hémagglutination et par l'immunodiffusion (photos 6, 18, 20 et tableau 18).

La réponse en anticorps du cheval n° 6 a été la plus élevée après la deuxième injection de rappel si l'on en juge par la réaction d'inhibition de l'hémagglutination.

De cette expérimentation (tableau 18) on peut remarquer que différents sérums ayant des titres en anticorps inhibant l'hémagglutination différente produisaient des lignes de précipitation d'intensité différente, bien que dans quelques cas les résultats des épreuves d'immunodiffusion correspondent à ceux observés dans les réactions d'inhibition d'hémagglutination (IHA). Cependant, les résultats obtenus dans la réaction de précipitation suggèrent que l'on avait affaire à une réponse en anticorps plus complexe et à un spectre plus large. Ainsi l'intensité des lignes de précipitation n'est pas en corrélation significative avec le titre hémagglutiant et les sérums ayant des titres égaux en anticorps inhibant l'hémagglutination semblent présenter des lignes de diffusion d'intensité différente. Si l'on met de côté quelques cas isolés, on n'a pas pu mettre en évidence d'anticorps diffusants, dans les sérums dont le titre inhibant l'hémagglutination était inférieur à 1/20.

Dans certains cas, des sérums titrant 1/40, 1/80 ou même 1/160 n'ont pas montré de lignes de précipitation ce qui indique que les anticorps responsables de ces deux réactions ne sont pas les mêmes.

Bien que des sérums de vaccinés, aient montré des lignes de précipitation simples avec le virus désintégré par le DOC, ce qui probablement est dû au constituant nucléo-protéique (NP) du virus et à ses anticorps correspondants. Cependant dans un petit nombre de sérums prélevés 4 semaines ou même entre 14 et 18 semaines après la vaccination, deux lignes de précipitation ont été notées parmi lesquelles la ligne intérieure rejoint la plus rapprochée du trou où l'on met l'antigène, celle formée par le virus traité par le DOC et l'immunsérum correspondant (photos 10, 12 14 et 20). Ceci correspond probablement au constituant NP comme on l'a décrit plus haut.

En aucun cas des lignes de précipitation n'ont pu être observées avec les sérums des chevaux témoins non vaccinés ni avec le liquide allantoïque normal ou la suspension chorioallantoïque normale, ce qui indique la spécificité de la réaction.

TABLEAU 18 : COMPARAISON ENTRE L'IMMUNODIFFUSION ET LA REACTION D'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION AVEC LE SERUM DE CHEVAUX VACCINES AVEC LE VACCIN ANTI-GRIPPE COMMERCIAL

Semaine de la récolte du sérum	Souche de virus	NUMERO DES CHEVAUX																			
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
		IH	ID	IH	ID	IH	ID	IH	ID	IH	ID	IH	ID	IH	ID	IH	ID	IH	ID	IH	ID
2	A_1	<20	-	<20	+	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-
	A_2	<20	-	<20	+	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-
4	A_1	160	+	160	+	80	+	40	-	160	-	160	+	160	+	80	+	160	+	1280	+
	A_2	640	+	80	+	80	+	80	+	80	-	80	+	160	+	320	+	320	+	1280	+
6	A_1	80	+	80	+	20	+	80	-	<20	-	160	+	80	+	80	+	20	-	640	+
	A_2	320	+	40	+	20	+	80	+	<20	-	80	+	80	+	80	+	160	+	640	+
8	A_1	20	+	40	+	<20	-	<20	-	<20	-	80	+	20	-	80	-	<20	-	<20	-
	A_2	80	+	40	+	20	-	20	-	<20	-	160	+	40	-	80	-	<20	-	40	-
10	A_1	<20	-	40	+	<20	-	<20	-	<20	-	<20	+	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-
	A_2	80	+	40	+	20	-	20	-	<20	-	80	+	<20	-	20	-	<20	-	40	-
12	A_1	<20	-	<20	+	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-
	A_2	40	+	40	+	<20	-	<20	-	<20	-	80	+	<20	-	20	-	<20	-	<20	-
		Injection de rappel avec le vaccin polyvalant de la grippe du cheval																			
14	A_1	20	-	20	+	<20	-	<20	-	<20	-	20	+	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-
	A_2	40	-	<20	+	<20	-	<20	-	<20	-	40	+	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-
16	A_1	320	+	20	+	40	+	160	-	<20	-	1280	+	80	+	<20	-	<20	-	<20	-
	A_2	320	+	20	+	20	+	80	+	<20	-	1280	+	160	+	40	+	20	-	<20	-
18	A_1	160	+	80	+	80	+	20	-	<20	-	640	+	80	+	<20	-	<20	-	<20	-
	A_2	160	+	40	+	40	+	20	+	<20	-	1280	+	160	+	<20	+	20	+	<20	-
20	A_1	160	+	40	+	40	+	<20	-	<20	-	320	+	20	+	<20	-	<20	-	<20	-
	A_2	320	+	40	+	40	+	20	-	<20	-	2560	+	160	-	40	+	<20	-	<40	-

LEGENDES

PHOTO 1.

Réaction entre le virus A/[illegible]gue1/56 traité au déoxycholate (DOC) et le sérum homologue préparé sur lapin.

(1) trou central : virus

(2) trous périphériques : sérum.

PHOTO 2.

Réaction entre le virus A/Equi/2/Alfort1/68 désintégré par le DOC et le sérum de lapin anti-A/Equi/1/Prague1/56.

(1) trou central : virus

(2) trous périphériques : sérum

PHOTO 3.

Réaction entre le virus A/E/1 Prague 1956 traité par le DOC et le sérum de lapin préparé contre les souches AE/1 Prague 1/56 et AE/2/Alfort1/68.

(1) trou central : antigène viral

(2) trous supérieur et inférieur : sérum anti-AE/1 Prague (lapin).

(3) trous supérieur droit et inférieur gauche : sérum anti AE/2/Alfort 1/68.

(4) trous supérieur gauche et inférieur droit : sérum normal de lapin

PHOTO 4.

Réaction entre le virus AE/1/Prague 56 traité par le DOC et le sérum de lapin préparé contre les virus AE/1/Prague 56 et AE/2/Alfort 68.

(1) trou central : antigène viral.

(2) trous inférieur et supérieur : sérum anti AE/1/Prague 56 préparé sur lapin.

(3) trous supérieur et inférieur gauches : sérum anti AE/2/Alfort 68.

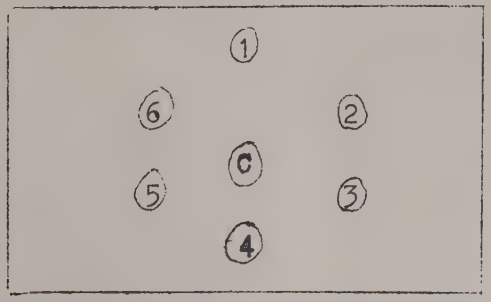
(4) trous supérieur et inférieur droits : sérum normal de lapin.

Légende des photos d'immunodiffusion (5 à 22)

Liste des sérums utilisés dans les épreuves d'immunodfffusion et désignationdes trous respectifs. Pour les photos 5 à 22, sérums de chevaux vaccinés avec du vaccin anti-grippe équine polyvalent (voir résultats tableau 18).

Désignation des trous. Dans tous les cas les trous sont désignés suivant le schéma ci-dessous sauf le cas contraire.

GRAPHIQUE



Trou central : antigènes

Sur les planches 5, 6, 9, 10, 13, 14, 15, 16 : virus AE/2/Alfort traité par le DOC.

Sur les planches 7, 8, 11, 12, 17, 18, 19, 10, 21, 22 : virus AE/1/Prague traité au DOC.

Trou n° 1 à 6 : sérums

Sur les planches 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 et 21 : sérum après vaccination, provenant de chevaux vaccinés, recueillis de 2 à 12 semaines à intervalles de 2 semaines.

Trou n° 1 à 5

Sur les planches 6, 8, 10, 10, 12, 14, 18, 20, 22 : sérum de chevaux vaccinés recueillis à intervalles de la 14ème à la 22ème semaine.

Trous n° 6

- Sur planches 6, 16 et 22 : sérums de cheval normal.
- Sur planches 8, 12, 18, 22 : sérum de lapin anti AE/1/Prague.
- Sur planches 14 et 10 : sérums anti AE/2/Alfort préparés sur lapin.

10) Anticorps fluorescents

La technique des anticorps fluorescents s'est montrée très sensible pour la mise en évidence des antigènes viraux, à différents stades de leur développement en cultures cellulaires. Dans bien des cas, les résultats obtenus avec les souches de virus grippal A1/Equi et A2/Equi se sont montrés semblables par la méthode directe comme par la méthode inditecte. La reproduction du virus en cultures cellulaires peut être mise en évidence par la technique d'immuno-fluorescence à partir de 4 à 8 heures après l'inoculation, ce temps dépendant de l'importance de l'inoculat.

Lorsqu'on étudie la formation d'antigène viral en cellules de rein de singe, de rein de veau embryonnaire et de rein de mouton embryonnaire par la technique d'immuno-fluorescence directe, on peut dès 4 heures après l'inoculation observer les premiers indices de fluorescence spécifique. Lorsqu'on inocule une dose de virus de 10^6 DICT 50 (dose infectieuse 50 % pour culture de tissus), un antigène fluorescent apparait indiscutablement dès 4 heures après l'infection dans le noyau cellulaire, et 3/4 environ des cellules présentent une fluorescence (photos 1, 2, 3, 4). La fluorescence est dispersée, soit granuleuse (photo 1), soit filamenteuse (photo 2 et 3); elle couvre presque tout le noyau, sauf quelques aires bien définies que l'on peut considérer comme correspondant aux nucléoles (photos 1 et 4). En général les cellules fluorescentes ne sont pas disposées au hasard dans la culture, mais tendent à se grouper entre elles.

6 heures après l'inoculation le nombre de cellules présentant une fluorescence intra-nucléaire augmente. La fluorescence granuleuse débute dans la zone péri-nucléaire (photos 5 et 6); chez certaines cellules ont peut observer une fluorescence à la fois dans le noyau et le cytoplasme (photo 6).

A 8 heures la fluorescence atteint son degré maximal. L'antigène n'est plus limité à la région péri-nucléaire mais a diffusé dans le cytoplasme entier (photos 7 à 10). Dans bien des cellules la fluorescence s'est éteinte laissant à l'intérieur du noyau quelques masses mal définies, de fluorescence légère (photos 8 à 10). Dans quelques unes des autres cellules, la fluorescence était répartie aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme (photo 11),et dans les autres celle-ci est localisée dans la région péri-nucléaire et aussi dans le cytoplasme, mais le noyau reste complément vide. (photo 7).Ici la fluorescence cytoplasmique reste par la suite inchangée, tandis que s'accroit le nombre de cellules présentant une fluorescence nucléaire jusqu'à ce qu'elles commencent à dégénérer

De 12 à 16 heures des lésions marquées apparaissent dans les cultures cellulaires, et une fluorescence diffuse généralisée commence à apparaître (photo 12). Le nombre de ces cellules augmente graduellement. A partir de 14 heures, l'intensité de la fluorescence des cellules atteintes et les agrégats cellulaires diminuent, phénomène dû apparemment à la libération de l'antigène viral par les cellules. La description du cours de l'atteinte cellulaire est arbitraire, puisque l'on peut observer à tout moment des cellules aux différents stades de l'infection.

La séquence de formation de l'antigène viral dans les cellules infectées avec un inoculat important (10^7 à 10^8 DICT 50), telle qu'elle apparait en utilisant la technique d'immuno-fluorescence indirecte est presque la même, à ceci près que les intervalles de mise en évidence de la fluorescence nucléaire sont plus courts avec un inoculat plus important. L'évolution dans le temps, de la fluorescence révélée par la technique directe, est semblable, dans les cellules infectées par un inoculat moyen; cependant on n'a pas pu mettre en évidence la fluorescence exclusivement dans le noyau, pour les cellules infectées d'une dose massive de virus (10^6 à 10^7 DICT 50). Dans de tels cas les premiers indices de fluorescence sont apparus dans le noyau, la région péri-nucléaire, le cytoplasme ou bien partout à la fois (photos 13, 14, 19, 21 et 22) et ceci 4 heures après l'infection. Dans des cellules où la multiplicité d'infection était la même, 6 heures après celle-ci on a pu observer une fluorescence d'intensité variable dans le noyau et la région péri-nucléaire (figures 15 et 15). Dans d'autres cellules la fluorescence couvrait tout.

La séquence du développement intracellulaire de l'antigène a été suivie au moyen des anticorps fluorescents, en utilisant diverses doses de virus de semence, et en comparant entre elles des multiplicités d'infection élevée et faible. Lorsqu'on inoculait les cellules avec 10^6 DICT 50 de virus, dès 4 heures après l'infection on pouvait observer l'apparition de l'antigène S dans le noyau; 75% environ des cellules présentaient une fluorescence brillante. D'un autre côté, avec une multiplicité d'infection de 10^1 à 10^2 DICT 50 par cellule, on n'a mis en évidence l'antigène S que 6 heures après l'infection. A 8 heures, environ 25% des cellules présentaient une fluorescence. De 10 à 16 heure l'antigène s'était développé

dans environ la moitié des cellules. Celles-ci présentaient des stades de développement variés, allant de la cellule présentant seulement l'antigène à l'intérieur du noyau, à la cellule montrant une brillante fluorescence de tout le cytoplasme, alors que le noyau était très peu fluorescent ou même pas du tout (photos 17, 18).

La séquence de développement de l'antigène viral, étudiée au moyen des anticorps fluorescents, s'est révélée presque la même pour les trois types de cellules utilisées pour cette expérience, et de même pour les deux souches A1/Equi et A2/Equi. En cellules de rein de singe, la fluorescence, après 8 heures d'infection par le virus à multiplicité très élevée, était si diffuse en dehors des cellules qu'il était difficile de les distinguer isolément. Dans cette expérience les cellules de rein de mouton embryonnaire ont paru moins sensibles que les deux autres types de cultures cellulaires bien que tous les cycles de la production de l'antigène viral n'aient pas pu être étudiés dans ce cas.

LEGENDES DE L'IMMUNOFLUORESCENCE

PHOTO 1.

Cellules de rein de veau embryonnaire infectées avec 10^3 DICT 50 de virus A2/Equi 4 heures après l'infection. Technique indirecte. Fluorescence granuleuse dans le noyau.

PHOTO 2.

Cellules RV infectées avec 10^3DICT 50 de virus A2/Equi 4 heures après infection. Technique indirecte. Fluorescence granuleuse et filamenteuse à un certain degré dans le noyau.

PHOTO 3.

Cellules RS infectées avec 10^3DICT 50 de virus A1/Equi 4 heures après l'infection. Technique indirecte. Fluorescence granuleuse et filamenteuse à un certain degré dans le noyau et dans une cellule : présence d'une fluorescence périnucléaire et cytoplasmique.

PHOTO 4.

Cellules RV infectées avec 10^3 DICT 50 de virus A 2/Equi 4 heures après l'infection. Technique indirecte. Présence d'une fluorescence granuleuse et filamenteuse dans le noyau.

Remarquer la présence de fluorescence dans le cytoplasme de deux cellules (à 12 heures).

PHOTO 5.

Cellules RS infectées avec le virus A2/Equi de multiplicité d'infection 1-2 DICT 50 par cellule 6 heures après l'infection. Technique indirecte. Fluorescence uniquement dans la région périnucléaire. Quelques traces de fluorescence granuleuse dans le noyau.

PHOTO 6

Cellules RS infectées avec 1-2 DICT 50 de virus A2/Equi 6 heures après l'infection. Technique indirecte. Fluorescence présente dans la région périnucléaire, gagnant le cytoplasme.

PHOTO 7

Cellules RS infectées avec le virus AE/Equi de multiplicité d'infection 10^{6-8} DICT 50. Technique directe. 8heures après l'infection. Fluorescence distincte périnucléaire et commençant à diffuser dans le cytoplasme.

PHOTO 8

Cellules RS infectées avec 10^{6-8} DICT 50 de virus A2/Equi 8 heures après l'infection. Technique indirecte. Fluorescence granuleuse autour du noyau et dans le cytoplasme. La fluorescence nucléaire disparaît lentement.

PHOTO 9

Cellules RS infectées avec 10^{6-8} DICT 50 de virus A2/Equi 8 heures après l'infection. Technique indirecte. Fluorescence dans la région périnucléaire gagnant le cytoplasme. La fluorescence

nucléaire disparaît mais on peut encore la remarquer dans certains noyaux.

PHOTO 10.

Cellules RM infectées avec le virus A2/Equi 8 heures après l'infection. Technique indirecte. Fluorescence dans le cytoplasme. En comparaison le noyau est sombre.

PHOTO 11.

Cellules RV infectées avec le virus A2/Equi 8 heures après infection. Méthode indirecte. Fluorescence cytoplasmique. En comparaison le noyau est sombre.

PHOTO 12.

Cellules RV infectées avec le virus A1/Equi 16 heures après infection. Technique indirecte. Fluorescence cytoplasmique. Dans plusieurs cellules le noyau est complètement sombre.

PHOTO 13.

Cellules RV infectées avec 10^3 DICT 50 de virus A2/Equi 4 heures après infection. Technique directe. Fluorescence granuleuse et filamenteuse dans le noyau, fluorescence distincte dans la région périnucléaire.

PHOTO 14.

Cellules RS infectées avec le virus A2/Equi multiplicité d'infection 10^{6-8} DICT 50, 4 heures après infection. Technique directe. Présence de fluorescence dans le cytoplasme. Pas de fluorescence nucléaire.

PHOTO 15.

Dans la même lame (photo 21) la fluorescence commence à disparaitre dans le noyau.

PHOTO 16.

Cellules RV infectées avec le virus A2/Equi de multiplicité d'infection 10^{6-8} DICT 50 , 6 heures après infection. Technique directe. Fluorescence nucléaire. Légère fluorescence dans le cytoplasme.

PHOTO 17.

Cellules RM infectées avec le virus A2/Equi 16 heures après infection. Technique directe. Fluorescence dans le cytoplasme dans une cellule, fluorescence, dans le cytoplasme et dans le noyau.

PHOTO 18.

Cellules RV infectées avec 10^{6-8} DICT 50 de virus A2/Equi 16 heures après infection. Technique directe. Fluorescence cytoplasmique.

HISTOPATHOLOGIE

Les cellules RS, RFC, RM, les lignées Vero et les cellules RV infectées avec des souches de virus grippal Equi 1 et 2 ont été colorées à l'hémalun-éosine et examinées au faible (4 x 10) et au fort (4 x 100) grossissement. Ces examens n'ont montré aucune lésion histopathologique spécifique, en dehors des signes de destruction cellulaire (photos 6 à 10). L'intensité de la destruction était plus ou moins semblable dans toutes les cellules. Cependant au stade le plus tardif, l'intensité de la destruction cellulaire par le virus se montrait réduite (photos 11 et 12.).

Comme les images de destruction cellulaire présentées par les souches Equi 1 et Equi 2 sont semblables, nous n'avons présenté ici qu'une seule des deux séries de figures.

LEGENDES DES PHOTOS DE L'HISTOPATHOLOGIE

PHOTO 1. : Cellules RS normales (X 120).

PHOTO 2. : Cellules RS infectées par AE2/Alfort (X 120).

PHOTO 3. : Cellules RFC normales (X 120).

PHOTO 4. : Cellules RFC infectées par AE2/Alfort.

PHOTO 5. : Cellules RM normales (X 12P).

PHOTO 6. : Cellules RM infectées par AE2/Alfort (X 120).

PHOTO 7. : Cellules Vero normales (X 120).

PHOTO 8. : Cellules Vero infectées par AE2/Alfort (X 120).

PHOTO 9. : Cellules RV normales (X 120).

PHOTO 10.: Cellules RV infectées par AE2/Alfort.
1er passage (X 120).

PHOTO 11.: Cellules RV infectées par AE2/Alfort.
15ème passage (X 120).

PHOTO 12.: Cellules RV infectées par AE2/Miami.
10ème passage (X 120).

DISCUSSION

Multiplication du virus grippal en cultures cellulaires.

Le virus grippal peut être cultivé en culture de cellules primaires provenant de divers animaux (Hinz et Syverton, 1959; Taufel, 1968), RS (Mogabgab et coll., 1955), de veau (Lehmann-Grube, 1964; Fontaine et Petermann, 1969) et plusieurs autres lignées cellulaires continues, telles que la souche de cellules conjonctivales de Chang (Wong et Kilbourne, 1961), les cellules diploïdes de poumon humain embryonnaire (souche WI 38) (Tumova et Fedova, 1968). Fontaine et Petermann (1969) ont également relaté l'adaptation de la souche A Equi A Prague/56 aux cellules BHK 21. Outre ces différentes publications, plusieurs rapports ont souligné le fait que la multiplication du virus grippal en cultures cellulaires n'aboutit pas toujours au stade final de sa production; seuls sont produits l'antigène S et l'hémagglutinine non infectieuse de telle sorte que la souche ne peut être passée en série (Henle et coll., 1955; Franklin et Breitenfeld, 1959; Hills et coll., 1960; Holtermann et coll., 1960).

La présente tentative d'adaptation des souches A 1/Equi et A 2/Equi aux cellules de RS, embryonnaires de poulets, de rein de foetus de cheval, de rein de mouton et les lignées Vero de cellules de cercopithèque s'est soldée par un échec.

Dans les cellules embryonnaires de poulet, de rein de foetus de cheval, de rein de mouton et Vero, ces virus ne peuvent être transmis plus d'un seul passage. Ce résultat s'accorde avec celui de Taufel (1968) qui a rapporté des résultats semblables lors de la culture d'une souche de virus grippal A2/Equi sur fibroblastes d'embryon de poulet. Fontaine et Petermann (1969) ont discuté la nature fibroblastique des cellules de rein de poulain, lors de leur tentative infructueuse d'adaptation du virus de la grippe équine à ce système cellulaire.

Cependant on a utilisé des cellules de rein de foetus de cheval (RFC), de rein de mouton (RM) et des cellules Vero, pour la première fois dans cette expérience, pour la culture du virus grippal.

Pour la même raison, probablement la nature fibroblastique des cellules, on a constaté la difficulté d'adaptation du virus grippal à ces cellules.

Les autres raisons possibles de la difficulté d'adaptation en série du virus grippal aux cellules citées ci-dessus peuvent être :

- soit la production de virus incomplet au cours de la multiplication (Henle et coll., 1955; Holtermann et coll., 1960; Hills et coll., 1960);

- soit la production d'inhibiteurs viraux durant le cycle de multiplication du virus.

La faculté de multiplication du virus grippal dans certains types cellulaires est une propriété très spécifique par laquelle des souches peuvent différer alors qu'elles sont par ailleurs étroitement

apparentées ou même identiques en apparence. Un bon exemple en est donné par les différentes souches de virus de la grippe équine cultivées en cellules de RV. La souche AE/1/Prague perd sa capacité de multiplication dansce système cellulaire tout de suite après le 1er passage, ce qui correspond aux observations déjà faites par Fontaine et Petermann (1969), dans lesquels la souche AE/E/N.Y. a perdu cette capacité après trois passages successifs.

L'explication très vraisemblable de ce phénomène serait la production d'un inhibiteur viral, pendant le processus d'interaction cellules-virus, comme cela a été décrit plus haut. Si c'est bien le cas, la quantité d'inhibiteur produite par différents virus dans la même culture cellulaire ou par un virus dans différentes cultures cellulaires peut ne pas être la même; autrement dit certaines cellules peuvent se montrer plus productives en inhibiteur viral que d'autres. C'est pouquoi dans certains systèmes cellulaires les virus ne peuvent se multiplier au delà du 1er passage, tandis que dans d'autres ils peuvent atteindre 3 ou 4 passages; après quoi la production d'inhibiteurs viraux devient si élevée que le matériel de semence, lorsqu'on l'inocule pour un passage ultérieur, pourrait inhiber complètement la pénétration du virus à travers la paroi cellulaire. Cependant cette hypothèse nécessiterait de nombreuses études ultérieures pour confirmation.

Parmi les quatre souches de virus(1 A1/Equi et 3 A 2/Equi) que nous avons tenté de cultiver en cellules de RV, 2 seulement ont permis une multiplication en série sur ce système cellulaire : ce sont deux souches A 2/Equi, à savoir AE/2/Alfort et AE/2/Miami. Jusqu'à présent ces virus ont subi 16 et 10 passages respectivement; il est trop tôt pour pouvoir dire s'ils sont réellement adaptés.

La production d'hémagglutinine et d'antigène S par ces virus était très faible, comparée aux virus cultivés dans l'oeuf; mais en ce qui concerne la réaction d'inhibition de l'hémagglutination, il convient de dire que le virus cultivé sur cellules était inhibé spécifiquement par le sérum presque au même titre que la souche allantoïque du même virus.

D'un autre côté, l'hémadsorption produite par ces virus était décelable dans les 24 heures après l'infection, et l'effet cytopathogène (ECP) apparaissait généralement en 72 et 96 heures, de façon presque constante. Ces données s'accordent en général avec celles que d'autres auteurs ont obtenues (Lehmann-Grube, 1964; Pett et Teufel, 1966; Fontaine et Petermann, 1969). Ces auteurs cependant n'ont pas étudié la production d'antigène soluble ni même d'hémagglutinine intracellulaire.

Lors de la démonstration par immunofluorescence de la réplication de la souche de virus AE/2/Alfort au 8ème et au 15ème passages, les premiers signes de fluorescence granuleuse ont été mis en évidence 8 à 12 heures après l'infection. Dans les deux cas les cellules ont été inoculées avec la même quantité de surnageant de cultures cellulaires. Cependant la détermination du nombre de doses 50 % dans le liquide inoculé n'a été faite dans aucun des deux cas. Comme nous le verrons plus loin dans le chapitre des anticorps fluorescents, lorsque les cultures cellulaires ont été inoculées par le virus grippal à multiplicité d'infection élevée, les premiers signes de fluorescence nucléaire ont été décelés 4 heures après l'infection. Ce retard d'apparition de la fluorescence dans le premier cas peut être dû, soit au moins grand nombre de particules infectieuses dans le matériel d'inoculation et à un plus grand nombre de particules virales incomplètes, soit à la présence d'inhibiteur viral, soit à

ces deux causes réunies. Cependant, le titrage de l'hémagglutinine du virus cultivé en cultures de tissus aussi bien que du virus d'inoculation a été effectué dans tous les cas. Le résultat s'est toujours montré plus faible que pour le virus cultivé sur oeuf comme nous l'avons vu ci-dessus; ceci ne donne jamais une idée exacte du nombre de particules infectieuses présentes dans le matériel étudié. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Fedova et Tunova (1968) qui n'ont pu mettre en évidence qu'àprès 17 heures les premiers signes de fluorescence nucléaire en cellules diploïdes infectées avec le virus de la peste aviaire au 15ème passage sur cellules. Ils ont essayé d'établir une corrélation entre cette observation et l'inoculation d'une dose faible de virus qu'ils ont estimée à 0,0015 DI 50 (oeuf) par cellules. Ils ont également fait mention de l'absence d'antigène S dans le second passage du virus de la peste aviaire sur cellules WI-38. Ils ont aussi discuté l'hypothèse qu'en étudiant seulement le premier passage, c'est-à-dire les quelques premiers cycles de reproduction, on pouvait aboutir à de fausses conclusions, puisque un cycle de reproduction abortif pendant cet intervalle est quantitativement comparable au cycle infectieux. Ce n'est que plus tard qu'il vient à en différer à la fois sur le plan quantitatif et sur le plan qualitatif. D'un autre côté Fraser (1967 a) pense qu'il n'y a pas de différence entre les cycles infectieux et abortif en ce qui concerne la synthèse intracellulaire d'antigène S et son transfert dans le cytoplasme.

Les observations faites Fraser (1967 a), Fedova et Tunova (1968) et nous-même dans la présente expérience, peuvent suggérer que tout virus commence sa reproduction dans ce système cellulaire, par un cycle infectieux qui peut ensuite se transformer en un cycle abortif. Fraser (1967 b) a proposé, comme cause possible de l'apparition d'un cycle défectif, l'incompatibilité des cellules à recevoir l'informa-

tion d'ARN viral ou des anomalies de l'ARN qui peuvent survenir au cours du 1er cycle infectieux.

Cycle de croissance du virus grippal

De vastes études sur la multiplication du virus grippal d'origine humaine ont été faites (Hoyle, 1948, 1950; Henle et Henle, 1949). A l'exception de quelques publications dispersées (Sugiura et coll., 1962), jusqu'à présent de telles études n'ont pas été faites en cultures cellulaires. Dans le présent travail une étude comparative du cycle de croissance du virus grippal A d'origine équine a été effectuée dans deux systèmes cellulaires, à savoir cellules RV et RM, ainsi que dans l'embryon de poulet, et ceci en prenant en considération la production d'antigène S et d'hémagglutinine.

Lorsqu'une grosse dose de virus grippal A est inoculée dans des cellules sensibles, le premier signe de multiplication du virus est l'accroissement logarithmique de l'antigène soluble (S) fixant le complément, lequel se produit entre 2 et 4 heures après l'infection. Dans les conditions de l'expérience décrite, l'antigène S a été décelé dans la suspension de membrane chorioallantoïque dès 2 heures après l'infection, tandis que en cellules RV et RM l'antigène S associé aux cellules pouvait être mis en évidence 3 et 4 heures après, respectivement. Le site de la production de l'antigène S est le noyau des cellules infectées comme le montrent les études d'immunofluorescence (Holtermann et coll., 1960; Hill et coll., 1960; Sugiura et coll., 1962; Kamforin, 1968; et nous-même dans le présent travail au chapitre d'immunofluorescence). Cet antigène peut être libéré par congélation et décongélation, par traitement aux ultra-sons, ou par les deux méthodes combinées. Le titre de l'antigène S s'accroît rapidement jusqu'à 8 heures dans les trois systèmes d'hôte et cet accroissement peut durer jusqu'à 24 heures. Les conclusions sont en général en accord avec celles d'autres auteurs (Hoyle, 1948, 1949, 1950;

Hoyle, 1952 c; Sugiura et coll., 1962).

Le second indice de multiplication virale est la présence de l'hémagglutinine associée aux cellules, que l'on peut mettre en évidence 3 heures après l'infection et dont le titre continue à s'accroître jusqu'à 16 heures, restant stable ensuite jusqu'à 24 heures. La courbe de croissance de l'hémagglutinine intracellulaire commence à décroître alors que la courbe de l'hémagglutinine libre augmente dans la phase liquide. Ce résultat est en accord avec ceux de Hoyle (1948, 1950) et Henle et Henle (1949) dans l'embryon de poulet, et ceux de Sugiura et coll. (1962) en cellules RS.

Hoyle (1949) lors de son étude sur la multiplication du virus grippal, a décrit le phénomène suivant : lorsqu'une forte dose de virus est inoculée dans la cavité allantoïque de l'embryon de poulet en incubation, 90 % environ du virus est pris par les cellules de la membrane chorioallantoïque (MCA) et les extraits de membrane 3 heures après l'infection n'agglutininent pas les érythrocytes. De tout ceci l'auteur a conclu qu'à ce stade la majeure partie du virus adsorbé par les cellules parcourt ce que l'on appelle la phase intracellulaire dans laquelle la multiplication du virus prend place. Après 6 heures, des particules virales infectieuses réapparaissent dans les cellules et sont presque aussitôt excrétées dans le liquide allantoïque. Pendant la phase intracellulaire il y a production d'antigène S, que Hoyle (1948) pense être constitué par une nucléoprotéine, ce qui a été confirmé plus tard par différents auteurs par immunofluorescence, comme nous l'avons déjà dit. Hoyle (1945) a émi également l'hypothèse que l'antigène S pouvait représenter le virus grippal réduit à son minimum de taille particulaire et que les antigènes S de toutes les souches de virus grippal A se montraient sérologiquement identiques. Ceci a été confirmé plus tard par divers auteurs

(Lief et Henle, 1956; Lief, 1963) et nous-même dans le présent travail.

Des études que nous avons conduites dans cette expérience, il résulte que la multiplication du virus grippal suit plus ou moins le même cours dans l'embryon de poulet qu'en cultures cellulaires. Dans le cas de l'embryon de poulet (Hoyle, 1948; Henle et Henle, 1949) aucune trace d'activité virale ne peut être obtenue dans les cellules dans les trois premières heures qui suivent l'infection; c'est ce que l'on appelle la phase d'éclipse (terme repris des travaux français anciens de Constantin Levaditi et coll.) avant l'apparition d'antigène S. On a cependant insisté sur le fait que la fixation du complément aussi bien que l'hémagglutination requièrent l'accumulation d'une quantité relativement importante de matériel antigénique avant que ce dernier puisse être mesurable (Henle et Henle, 1949). Si nous examinons la courbe de croissance, nous constatons qu'il y a une différence appréciable dans le titre des antigènes S produits par la MCA et les cultures cellulaires, ce titre étant plus élevé dans le premier cas. Cependant Sugiura et coll. (1962) ont montré l'existence d'un développement d'antigène S jusqu'à 5 log. dans leur expérimentation sur cellules RS alors que dans cette expérience ce titre ne monte qu'à trois log, même en MCA.

De cette observation, nous ne concluons pas nécessairement que l'utilisation d'embryons de poulets doive être complètement laissée de côté dans l'étude du virus grippal et doive être remplacée par l'usage de cultures cellulaires. Quoique les cultures cellulaires ne soient pas toujours susceptibles de fournir les mêmes résultats, elles peuvent assurément se substituer à l'hôte habituel en ce qui concerne la production d'antigène S et d'hémagglutinine pour l'usage quotidien au laboratoire. Considérant tous les avantages des cultures

cellulaires qui ont été décrites partout ailleurs, on peut penser qu'elles peuvent aboutir souvent à une meilleure compréhension des résultats de certaines études détaillées sur les virus.

Fixation du complément et réactions croisées

Les résultats de la présente recherche confirment en outre les données antérieurement établies, à savoir qu'il n'y a pas de partage d'antigènes spécifiques de souche entre les virus grippaux, humain et équin (McQueen et coll., 1968). Cependant les deux sous-types possèdent le même antigène S, aucune différence ne pouvant être mise en évidence entre les différents antigènes S des souches homologues (Lief et coll., 1958; Lennette et Horsfall, 1940; Hoyle, 1945; Lief, 1963), alors qu'il y a une discordance nette entre les antigènes S dérivant de souches de grippe B et les sérums hétérologues (Lennette et Horsfall, 1940; Lief et Henle, 1956; Lief et coll., 1958).

A l'opposé de ces résultats sont ceux obtenus par Davenport et coll. (1964), qui ont suggéré que le succès qu'ils ont obtenu, en démontrant l'existence d'un certain degré de spécificité sérologique chez les antigènes S de différentes souches de type A, pouvait en partie être attribué à la méthode du traitement à l'éther utilisée pour extraire l'antigène S. Cependant Lief (1963) n'a pas pu démontrer qu'il existait de telles spécificités de souche dans les antigènes S provenant de différentes souches de grippe d'origines humaines et animales, préparées par la même méthode. Prenant toutes ces discussions en considération, nous avons préparé, au cours de notre expérimentation, l'antigène S sur cultures cellulaires ainsi que sur suspension de MCA (membrane chorioallantoïque), par adsorption de l'antigène V sur érythrocytes de coq et non pas par traitement à l'éther.

Lief a bien démontré que, même après adsorption exclusive avec des érythrocytes de poussin, les préparations d'antigènes S montraient la présence d'hémagglutinine à un titre faible lorsqu'on les examinait avec les érythrocytes de cobaye; ces préparations montraient d'ailleurs une activité hémagglutiniante hors de proportion avec le titre d'hémagglutinine rédiduelle. Dans ces mêmes préparations cette activité demeure intacte, même après que la totalité des hémagglutinines eût été retirée par adsorption ultérieure sur globules rouges de cobaye. Dans nos préparations d'antigène S, aussi bien celles qui proviennent de cultures cellulaires que celles venant de la MCA, l'hémagglutinine libre était complètement retirée après 2, parfois 3 cycles d'adsorption; elle n'agglutinait plus les globules rouges de cobaye comme on l'a vu.

Cette aberration dans les résultats peut n'être due qu'à la quantité insuffisante d'érythrocytes de poussin que l'on utilise pour l'adsorption; ou bien c'est le temps de contact entre les érythrocytes et l'antigène qui n'était pas adéquat. Cependant la fixation du complément avec l'antigène V et les sérums correspondants n'a pas été effectuée dans notre expérimentation.

Des indices de l'existence d'un antigène V non hémagglutinant ont déjà été décrits (Hoyle, 1945). On ignore si le constituant V non hémagglutinant est le même que celui présent dans l'antigène S que l'on utilise pour l'immunisation des cogs, et qui est susceptible de causer le rappel d'anticorps contre l'antigène V que l'on observe chez les animaux mis en condition par une inoculation antérieure avec une souche de virus actif étroitement apparentée (Lief, 1963).

Dans l'expérimentation présente, l'antigène S préparé à partir de la souche AE2/Alfort sur RV et RM, ainsi que sur MCA d'embryons de poulet, fixait le complément en présence de sérum de cobaye dirigé contre l'antigène S provenant de la souche grippale AE2/Alfort, ainsi qu'avec un sérum humain de convalescent recueilli chez un sujet suspect d'une infection à virus A2/Hong Kong à peu près au même moment, ce qui témoigne de la spécificité de type que possède l'antigène préparé à partir de n'importe laquelle de ces différentes sources. L'étude de la spécificité de souche de l'antigène V n'a pas été faite au cours de cette expérience. Suharto et Tumova (1967) ont rapporté leur succès lorsqu'ils ont utilisé la culture cellulaire pour la préparation de l'antigène V. Cependant, ils n'ont pu réussir à préparer l'antigène S provenant de la même source.

Inhibition de l'hémagglutination (IHA) et réactions croisées

Nous avons utilisé les antigènes agglutinants, provenant des souches grippales AE1/Prague, AE2/Alfort, A2/Hong Kong et B/England constitués de liquide allantoïque traité à l'éther. Ces antigènes étaient inhibés spécifiquement par les immunséruns préparés sur poulet, à titre très élevé en réaction d'inhibition homologue, à titre faible ou nul en réaction hétérologue. Cette importante différence entre deux systèmes correspondant en général à ce qui a été trouvé par les autres auteurs (McQueen et coll., 1965; Minuse et coll., 1965; McClelland et Haye, 1941).

Jusqu'à une période récente, une grande partie des données tendant à établir une parenté possible entre les virus grippaux humain et animal, était fondée sur des résultats sérologiques,

l'examen des sérums humains suggérant que des virus animaux pouvaient avoir causé certaines épidémies humaines dans le passé. C'est ainsi qu'on a pu mettre en évidence une parenté antigénique entre le sérotype humain A et les souches de la grippe du porc, et plus récemment entre le même sérotype humain A et les virus grippaux aviaire et équin (Pereira et coll., 1967; Webster et Pereira, 1968; Kasel et coll., 1969). Tumova et Easterday, (1969) ont aussi décrit une parenté antigénique entre les souches humaines A2 et les souches équine et aviaire du virus grippal.

Minuse et coll. (1965) aux Etats-Unis, ainsi que Schild et Stuart-Harris (1965) en Angleterre, ont rapporté que quelques sérums provenant de sujets âgés de plus de 60 ans contenaient des anticorps inhibant l'hémagglutination vi-à-vis des souches Milford et Miami de grippe Equi 2. Il est intéressant de remarquer que ces anticorps anti Equi 2 ont été trouvés dans le sérum d'individus d'âge supérieur à 65 ans aussi bien en Amérique qu'en Angleterre, et qu'ils suggèrent qu'un virus étroitement apparenté sérologiquement aux souches Equi 2 était répandu dans la population humaine aux environs de 1900. Aux Etats-Unis les anticorps anti Equi 2 ont été mis en évidence dans le sérum de volontaires humains inoculés expérimentalement avec la souche Equi 2 (Kasel et coll., 1965); cependant en Angleterre, Rosa 1966; McQueen et coll., 1968), les sujets en contact étroit avec des chevaux infectés par les virus Equi 1 et Equi 2 n'ont pas présenté de réponse sérologique vis-à-vis de l'un ou l'autre de ces deux virus.

Les résultats relatés dans la présente étude indiquent qu'il y a un certain chevauchement antigénique entre les virus de la grippe A d'origine humaine et équine; ceci peut être mis en évidence

par l'épreuve d'inhibition de l'hémagglutination à un titre très bas. Cependant les virus de la grippe B ne montrent aucune réaction croisée de ce genre avec les virus A. Ce fait suggère en grande partie les observations de Gorbunova et Sokovyck (1967) qui ont démontré l'existence de réactions identiques entre les souches A1 et A2, mais non pas entre les souches A et B par épreuve d'IHA passive.

Une autre explication possible est que la légère réaction croisée que l'on remarque dans les souches grippales A lors de la réaction d'IHA serait due au partage d'un antigène viral de revêtement de composition neuraminidasique qui peut probablement être supprimé par traitement des sérums avec de la neuraminidase (Rose, 1966). Cette partie de l'expérimentation cependant n'a pas été effectuée dans notre étude et requiert confirmation.

Dans une autre série d'expériences, on a examiné vis-à-vis de sérums de poulet les hémagglutinines des souches AE1/Prague et AE/Alfort préparées sur différents systèmes cellulaires; elles ont montré une inhibition spécifique de l'hémagglutination à peu près au même titre que l'hémagglutinine du virus cultivé sur allantoïde. Cette observation suggère que pratiquement l'on peut utiliser, pour les épreuves d'IHA de routine au laboratoire, de l'hémagglutinine préparée sur l'un ou l'autre de ces systèmes cellulaires sensibles.

Immunodiffusion

Des sérums provenant de lapins immunsés mis à diffuser en présence de virus traités au désoxycholate de sodium (DOC) appar-

tenant aux souches A/Equi 1/Prague/56 et A/Equi 2/Alfort/68, donnent 3 à 4 lignes de précipitation en système antigène-anticorps homologue et 2 à 3 lignes de précipitation en système hétérologue. Aucun changement dans l'image des lignes n'apparait, même lorsqu'on laisse la diffusion se prolonger jusqu'à une semaine. L'image des lignes de précipitation suggère que l'anneau interne, situé le plus proche du trou central contenant l'antigène, et probablement formé par le constituant nucléoprotéique du virus fractionné par le D. O. C. s'avère identique au constituant que l'on trouve dans les souches grippales équines des sous-types A1 et A2. On peut observer également que le constituant nucléoprotéique (ou antigène S) se compose d'au moins deux constituants antigèniques. Des études ultérieures (Styk et Hana, 1966; Hana et Hoyle, 1966; Styk et coll., 1970 b) effectuées avec du virus grippal A fractionné par le DOC ont fourni des indications sur l'identité de l'antigène S des différents sous-types de virus grippal A. Cependant les auteurs ont mis en évidence 4 lignes de précipitation distinctes ou même davantage; ils suggèrent l'existence de plusieurs composants antigéniques distincts dans le constituant nucléoprotéique ou antigène S. Ces différentes données indiquent probablement que le spectre en anticorps du sérum de cobaye immun est plus large que celui du sérum de lapin. L'existence d'une fraction antigénique nucléoprotéique identique dans les souches humaines A et d'origine aviaire a également été confirmée par d'autres groupes de chercheurs (Schild et Pereira, 1969; Samadieh et Bankowski, 1967). Cependant d'après leurs résultats, l'antigène S ne serait composé que d'un constituant antigénique simple. Ces résultats différents reflèrent probablement l'utilisation d'agents différents pour le fractionnement du virus. Samadieh et Bankowski (1971) ont utilisé l'éther pour disloquer la particule de virus grippal A;

ainsi obtinrent-ils des indications semblables sur la présence d'un antigène S identique chez différentes souches de virus grippal A. D'un autre côté Schild et Pereira (1969) ont obtenu deux lignes de précipitation avec la neuraminidase grippale. Ces différents résultats indiquent que les chercheurs devraient être prudents en choisissant l'agent de fractionnement de manière à obtenir des résultats nets, et de sensibilité accrue.

L'autre anneau, qui contient 2 à 3 lignes, avec surimppression d'au moins une ligne supplémentaire, laquelle se sépare dans certains cas sous la forme d'un petit spicule et ne montre pas une identité antigénique complète, est probablement constitué du composant hémagglutinant ainsi que du revêtement du virus, avec leurs anticorps correspondants. Styk et coll. (1963) ont également fait les mêmes suppositions qui cependant requièrent confirmation.

On peut aussi recueillir d'intéressantes informations à partir d'une autre série d'expériences dans lesquelles on a comparé la réponse en anticorps chez les chevaux vaccinés au moyen d'un vaccin composé contre la grippe du cheval (vaccin commercial) par réaction d'immunodiffusion et d'IHA. Dans la plupart des cas les résultats de l'épreuve de la réaction d'immunodiffusion correspondaient à ceux obtenus par les réactions d'IHA. Cependant, une réponse en anticorps plus complète et un spectre en anticorps plus large.

Dans des cas isolés, en examinant des sérums précoces, les réactions d'immunodiffusion semblent se montrer plus sensibles que les réactions d'IHA. Quelques sérums ont montré un accroissement du titre des anticorps, non par IHA mais immunodiffusion (ID). Ceci pourrait être dû au fait que l'on utilise pour l'immunodiffusion des sérums purs sans les diluer, contrairement à ce que l'on fait

dans l'IHA.; cela confirme les résultats obtenus par Styk et coll. (1970 a). Cependant ils ont pu également déceler des anticorps précipitants dans le sérum de chevaux non immunisés; à leur avis ceci serait dû à un contact antérieur avec quelques souches grippales A. Dans la présente étude, nous n'avons décelé aucun anticorps dans les sérums en immunisation chez aucun des chevaux. La seule raison pour cela peut être que ces chevaux n'avaient pas rencontré le virus grippal A auparavant. Une autre explication possible peut être la présence d'inhibiteurs non spécifiques dans le sérum normal, ce que Styk et coll. (1970 a) ont écarté en prévoyant quelques autres explications possibles.

Si l'on compare les sérums de 2 et 4 semaines, le spectre en anticorps de ces derniers est considérablement plus large; en outre il ne semble pas être influencé ultérieurement par une dose de rappel de vaccin, si l'on en juge par les résultats d'IHA et d'ID. Quelques cas, cependant, font exception (voir Résultats). Là encore ces données s'accordent avec celles des autres expérimentateurs (Styk et coll., 1970 a; Samadieh et Bankowski, 1971).

Quoique dans bien des cas le titre inhibant l'HA corresponde avec la mise en évidence d'anticorps par l'immunodiffusion, l'apparition de lignes de précipitation semble être indépendante de la présence dans le sérum des anticorps inhibant l'hémagglutination.

Ce manque de corrélation entre l'apparition d'une ligne de précipitation et la présence des anticorps IHA indique que les anticorps spécifiques de l'une ou l'autre réaction ne sont pas les mêmes de façon générale. Samadieh et Bankowski (1971) sont égalem-

ent du même avis, bien qu'ils aient décelé une certaine corrélation entre les anticorps responsables de l'immunodiffusion et de la fixation de complément.

Comme on l'a vu plus haut, dans certains cas l'épreuve d'ID s'est montrée beaucoup plus sensible que l'IHA. Ceci cependant ne signifie pas que l'épreuve d'IHA doive ou puisse être remplacée par l'ID. L'information fournie par la réaction d'ID est de nature différente. Elle ne peut donner cependant le même type de résultats de valeur, en ce qui concerne la parenté antigénique des souches virales, que celle qu'on obtient avec les réaction d'IHA.

Comme nous l'avons établi précédemment, l'exécution des épreuves d'ID reconnait certaines limites, lorsqu'on utilise le virus grippal ou des sous-unités virales. Il est nécessaire d'utiliser des antigènes purifiés et très concentrés si l'on veut obtenir des lignes de précipitation spécifique et distinctes. Malgré tout, le temps relativement court et la petite quantité de réactifs nécessaires pour exécuter la réaction, ainsi que la spécificité de celle-ci, sont des avantages en sa faveur lorsqu'il s'agit de déceler et d'identifier des virus grippaux.

Immunofluorescence (IF)

L'immunofluorescence a déjà été utilisée pour déceler plusieurs antigènes viraux, entre autres ceux du virus grippal A d'origine humaine . Suivant les publications qui ont été faites sur ce sujet, cette technique n'a pas jusqu'à présent été utilisée dans l'étude du virus de la grippe équine.

Dans le présent travail, nous avons utilisé la culture primaire de rein de cheval, de rein de veau embryonnaire et de rein de mouton embryonnaire. Ces cellules ont été inoculées avec le virus grippal A équin à différentes multiplicités d'infection et nous avons procédé à des études comparatives sur le sensibilité de différentes techniques d'immunofluo·escence en vue de déceler la présence d'antigènes viraux à différentes interv·lles de temps.

La séquence de production d'antigènes viraux dans les cellules infectées peut ne pas toujours rester constante dans les différentes conditions expérimentales réalisées; elle peut même varier, à conditions expérimentales égales. Les résultats obtenus dans les conditions des expériences que non décrivons, montrent une sensibilité à peu près égale dans les différents systèmes cellulaires mentionnés ci-dessus. Quoique de telles études comparatives sur la production d'antigène en différents types de cultures cellulaires n'aient pas été faites, Hills et coll., (1960) ont observé un aspect et une intensité semblables pour la coloration intranucléaire de l'antigène S en cellules Hela, tout comme en cultures de rein de veau après inoculation des cellules avec une haute multiplicité d'infection.

Cependant Kamforin (1968) a prétendu, en comparant le pourcentage des cellules infectées, que les fibroblastes d'embryons de poulet étaient plus sensibles que les rein de veau.

Dans notre expérience les deux techniques d'immunofluorescence directe et indirecte se sont montrées de sensibilité semblable pour la mise en évidence de l'accumulation d'antigène viral. Ce résultat

s'accorde avec ceux des autres expérimentateurs. Himma et Hummeler (1961) ont obtenu des images semblables pour la multiplication du virus poliomyélitique en utilisant trois techniques d'immunofluorescence. Kanforin (1968) a également publié des résultats semblables par ces deux techniques d'immunofluorescence, lors d'études sur la production de l'antigène viral en culture de fibroblastes d'embryons de poulet. Il a aussi déterminé le pourcentage d'infection cellulaire; mais ce dernier est omis dans notre expérimentation.

Lorsque les cultures cellulaires sont inoculées avec les souches grippales A1 et A2 Equi, le premier signe de fluorescence spécifique certaine apparait dans le noyau de la cellule. Le temps d'apparition initial de l'antigène varie de 4 à 6 heures en fonction de la multiplicité d'infection utilisée. Deux heures environ après cette apparition dans le noyau, l'antigène se concentre graduellement dans la zone périnucléaire et finalement gagne le cytoplasme. Pour terminer le cytoplasme entier est rempli d'antigène, alors que le noyau en est presque dépourvu. Ces observations s'accordent en grande partie avec celles des autres chercheurs (Sugiura et coll., 1962; Kanforin, 1968).

Breintenfeld et Schafer (1957) ont travaillé en cultures cellulaires d'embryons de poulet inoculés avec le virus de la peste aviaire. Ces auteurs ont trouvé que l'antigène était décelable en premier lieu dans le noyau de la cellule infectée; par le suite on pouvait le mettre en évidence également dans le cytoplasme. L'antigène hénagglutinant, de son côté, apparaît dans le cytoplasme un peu plus tard que l'antigène g (ou antigène S), plus particulièrement dans la région juxta-nucléaire de la cellule. Holtermann et Coll.,(1960)

ont obtenus des résultats comparables en suivant le développement d'une souche grippale A2 en cellules rénales d'embryons de veau; ils n'ont cependant pas mentionné l'apparition de l'antigène dans le noyau au stade le plus tardif du développement, exception faite pour Traver et coll., (1960) qui ont observé un phénomène analogue en cellules de poumon d'embryons de poulet inoculés avec la souche PR8. Sugiura et coll., (1962) ont également pu mettre en évidence le phénomène d'apparition de l'antigène S en cellules de rein de singe, entre 3 et 6 heures selon la multiplicité d'infection employée. Le processus d'inoculation d'antigène viral dans des cellules infectées avec le virus grippal à différentes multiplicités d'infection, que nous avons observé dans cette série d'expériences, correspond en général au tableau observé par d'autres expérimentateurs (Liu, 1955; Kanforin, 1968).

Les différentes apparitions de fluorescence spécifique dans les cellules infectées à différentes multiplicités d'infection suggèrent également que le rendement en virus infectieux doit être différent. Puisque la fluorescence nucléaire est due à la formation d'antigène S, il semble possible d'admettre qu'un rendement plus bas en virus infectieux est en rapport avec une synthèse moins intense de l'antigène S.

RESUME ET CONCLUSION

Nous avons étudié l'adaptation possible des souches virales de grippe équine. Cette étude a été menée sur les systèmes cellulaires suivants : RS, RFC, FEP, RM, cellules Vero et RV. Les 5 premiers systèmes cellulaires dans l'ordre ci-dessus ne donnent qu'un cycle de multiplication abortif; seules les cellules RV autorisent la croissance des souches AE2 (Alfort et Miami), mais pas celle des souches AE2/N.Y. et AE1/Prague. Ces souches grippales A Equi 2 ont, jusqu'à présent, subi respectivement 15 et 10 passages successifs et présentent des activités d'ECP, d'hémagglutination et d'hémadsorption. Cependant le titre hémagglutinant du virus en cultures cellulaires était toujours plus bas que celui du virus passé sur oeufs. L'hémagglutinine préparée sur cellules était inhibée de façon spécifique par l'immunsérum correspondant. Sur ces mêmes cellules la présence de l'antigène S intracellulaire anti AE2/Alfort fixant le complément, a également été observée au quinzième passage, mais le titre de l'antigène est plus faible que celui du matériel provenant du premier passage. Le virus AE2/Alfort montre, 8 à 12 heures après l'infection, une fluorescence granuleuse intranucléaire, et ceci entre le 10ème et le 15ème passage, aussi bien par la technique directe que par la technique indirecte.

Les productions intracellulaires d'antigène S fixant le complément et l'hémagglutinine en RV, RM et MCA se sont montrées presque parallèles. Sur MCA l'antigène S est décelable dès 2 heures après l'infection, tandis que en RV ou en RM ce n'est qu'après 3 ou 4 heures que l'on peut le mettre en évidence. Le titre d'antigène S s'accroît jusqu'à 24 heures.

L'hémagglutinine associée aux cellules est décelée après 3 heures dans tous les systèmes-hôtes; elle continuera à s'élever en titre jusqu'à 12 heures; après quoi elle reste constante jusqu'à 24 heures, puis commence à décliner. L'hémagglutinine libre apparaît 5 heures plus tard que la première et continue son ascension jusqu'à 24 h; elle reste au même titre jusqu'à ce que les cellules dégénèrent.

Dans les cellules infectées, l'hémadsorption a lieu 3 heures après l'infection et atteint 100 % des cellules après 5 h.

La production d'hémagglutinine libre est décelable dans les systèmes cellulaires que nous avons utilisés, à savoir RS, RFC, RM, RV, FEP et cellules Vero, lorsqu'on les inocule avec le virus grippal A1 et A2, 12 h après l'infection. Le titre maximal 1/64 à 1/128 est atteint après 24 h.

Lors de l'étude de l'agglutination de différents érythrocytes de mammifères par des souches de virus grippal, on a observé que le virus A1 Equi n'agglutinait pas les GR de rhésus. Les souches AE2/Alfort et AE2/Miami hémagglutinaient les érythrocytes de toute espèce animale. Les résultats obtenus avec les érythrocytes de poulet, humain du groupe 0 et de cobaye étaient plus ou moins comparables dans tous les cas.

Lorsque l'IHA et les réactions croisées correspondantes sont exécutées avec les souches de virus grippal AE1/Prague, AE2/Alfort, AE2/Miami, A2/H.K et B/England, et les immunséruns de poulet correspondants, on trouve un titre IHA et 1/1280 au moins en système antigène-anticorps homologues, alors qu'en système hétérologue, ce titre était inférieur à 1/80 ou même négatif.

L'antigène S préparé sur embryon de poulet avec le virus grippal A d'origine humaine et équine, fixe le complément en présence de sérum de cobaye préparé contre l'antigène S de n'importe laquelle de ces souches alors que l'antigène S provenant de souches B ne présentait pas un tel chevauchement vis-à-vis des sérums anti A. De la même façon le même antigène S préparé avec la souche A fixe le complément avec un échantillon de sérum humain de convalescent suspect d'infection à souche A2/H.K. mais pas l'antigène type B.

L'antigène S préparé avec la souche AE2/Alfort, sur RV, RM et MCA fixe le complément en présence de sérums anti-S de cobaye, et un échantillon de sérum humain de convalescent provenant d'un cas suspect d'infection grippale à type A2/HK.

Des lapins immunisés avec les souches A1 Equi et A2 Equi produisaient des anticorps utilisables en ID, sur gel d'agarose. Le système antigène-anticorps homologue donnait 3 à 4 lignes de précipitation, mais en système hétérologue on n'en obtenait que 2 à 3, avec le virus traité au DOC.

L'anneau formé par les lignes internes était dû au constituant nucléo-protéique du virus, alors qu'à l'extérieur les lignes ne formaient pas un anneau complet; on pense qu'elles seraient dues au revêtement externe du virus; mais ceci demande confirmation.

Nous avons étudié par les réactions d'ID et d'IHA la réponse en anticorps chez dix chevaux immunisés avec du vaccin anti-grippe équine combiné, du commerce, contenant les souches AE1/Prague, AE2/Alfort, AE2/Miami et PR8. Dans quelques cas les résultats des épreuves d'ID étaient comparés à la réaction d'IHA. Dans maints autres cas, spécialement avec les sérums précoces, l'épreuve d'ID s'est montrée plus sensible que la réaction d'IHA. Excepté chez trois chevaux, la réponse

en anticorps n'a pas été influencée par une dose de rappel de vaccin, à 12 semaines au moins, si l'on se fie aux réactions d'IHA et d'ID. Cependant dans bien des cas, les titres en anticorps déterminés par IHA et ID, étaient équivalents.

Nous avons pu démontrer l'apparition d'antigène contre la grippe du cheval, sur cellules RS, RV et RM par l'immunofluorescence, en techniques directe et indirecte. L'antigène correspondant (antigène S) a été d'abord mis en évidence dans le noyau des cellules infectées puis a migré ensuite dans le cytoplasme. Le temps de l'apparition de l'antigène ainsi que l'intensité de la fluorescence varie de 4 à 8 heures après l'inoculation suivant le volume de l'inoculat. La sensibilité des techniques d'IF directe et indirecte, s'est révélé la même.

En conclusion nous pouvons dire que :

1°) Le virus grippal, outre l'oeuf embryonné, peut facilement être cultivé sur un certain nombre de cellules in vitro. Bien que la faculté d'adaptation de ce virus soit encore contestée, il semble établi que les cellules de rein de veau embryonnaire fournissent des conditions favorables aux passages en série de la souche A Equi 2. De toute façon, ce système cellulaire s'avère meilleur que l'oeuf embryonné pour l'étude en routine du cycle de croissance, ainsi que pour la production d'hémagglutinine et d'antigène S.

2°) L'immunodiffusion et l'immunofluorescence qui se sont montrées très sensibles pour déceler l'antigène viral, ne doivent pas pour autant remplacer les techniques classiques d'IHA et FC. En effet, les informations fournies par l'ID et l'IF diffèrent totalement de celles que donnent les autres réactions.

3°) Les virus grippaux d'origine humaine et équine ont en commun l'antigène NP; ceci confirme les conclusions des autres auteurs. La faible réaction croisée entre les souches A1 et A2 observée dans notre expérience par la réaction IHA peut être due soit au fait qu'il existe dans le revêtement viral un antigène commun, soit à la présence de la neuraminidase.

BIBLIOGRAPHIE

G.L. ADA et B.T. PERRY : (1954) : Studies on the soluble complement fixing antigens of influenza virus.3 The nature of the antigen. Australian J. exptl. Biol. Med. Sc. 32, 177-186.

S.G. ANDERSON : (1948) : Mucine and mucoides in relation to influenza virus action. I. Inactivation by RDE and by viruses of the influenza groupe, of the serum inhibitor of hemagglutination. Australian J. exptl. Biol. Med. Sc. 26, 347-357.

C.H. ANDREWES; F.B. BANG et F.M. BURNET : (1955) : A short discription of the myxovirus groupe (influenza and related virus). Virology 1, 176-184.

C.H. ANDREWES; P.P. LAIDLAW et W. SMITH : (1935) : Influenza : Observation on the recovery of the virus from man and the antibody content of human serum. British J. exptl. Path., 16, 566-574.

J.C. APPLEBY et C.H. STUART-HARRIS : (1950) : The use of filtrates of Vibrio cholerae in the classification of influenza virus strains. British J. exptl. Path. 31, 797-805.

P. ATANASIU : (1964) : L'immunofluorescence. Application des anticorps fluorescent à la virologie. In "Technique de laboratoire en virologie humaine". Dirigé par Lépine, pp. 260-268 (ed. Masson & Cie., Paris).

W.I.B. BEVERIDGE et F.M. BURNET : (1946) : The cultivation of viruses and ricketsia in chick embryo. Med. Res. Council Rep. 256.

W.I.B. BEVERIDGE et M.A. ROSE : (1967) : Influenza in horses : Persistant of antibody measured by three methods. British vet. J., 123, 8-13.

P.M. BREITENFELD et W. SCHÄFER : (1957) : The formation of fowl plague virus antigens in infected cells as studied with fluorescent antibodies. Virology, 4, 328-345.

F.M. BURNET : (1940) : Influenza virus infections of the chick embryo lung. British J. exptl. Path. 21, 147-253.

F.M. BURNET et W.I.B. BEVERIDGE : (1943) : Titration of antibody against influenza by allantoic inoculation of the developing chick embryo. Australian J. exptl. Biol. Med. Sc., 21, 71-77.

F.M. BURNET et M. FOLEY : (1941) : Two methods for the detection of influenza viruses in human throat washing without the use of ferrets. Med. J. Australia, 3, 68-72.

J.G. CAMPBEL : (1959) : Anamnestic response in rabbits immunized with two related viruses. Australian J. exptl. Biol. Med. Sc. 37, 245-252.

O.M. CHALKINA et A.G. GULAMOV : (1943) : The use of white rats for the laboratory diagnosis of influenza. Zh. Mikrobiol. (Mosk) 10-11, 26.

P.W. CHOPPIN : (1969) : Replication of influenza virus in a continious cell line. High yiels of infectious virus from cells at high multiplicity. Virology, 39, 130-134.

A.H. COONS : (1958) : Fluorescent antibody methods. In "General Cytochemical Methods" (J.F. Danielli ed.). A.P., N.Y. Vol. 1.

B.B. COUCH; R.G.Jr. DOUGLAS; J.A. KASEL; S. RIGGS et V. KNIGHTS : (1969) : Production of influenza syndrom in man with equine influenza virus. Nature, 224, 512-514.

F.M. DAVENPORT et A.V. HENNESSY : (1956) : A serologic recapitulation of post experience with influenza A; antibody response to monovalent vaccine. J. exptl. Med., 104, 85-97.

F.M. DAVENPORT et A.V. HENNESSY : (1957) : Predetermination by infection and by vaccination of antibody response to influenza virus vaccines. J. exptl. Med., 106, 835-839.

F.M. DAVENPORT; A.V. HENNESSY; J. DRESCHER; J. MULDER et T. Jr. FRANCIS : (1964) : Further observations on the relevence of serologic replications of human infection with influenza virus. J. exptl. Med., 120, 1087-1097.

F.M. DAVENPORT; A.V. HENNESSY et T. Jr. FRANCIS • (1953) : Epidemiologic and immunologic significance of age distribution of antibody to antigenic variations of influenza virus. J. Exptl. Med. 98, 641-656.

F.M. DAVENPORT; A.V. HENNESSY et T. Jr. FRANCIS : (1955) : Persistant antibody orientation resulting from primary experiences with influenza viruses. 1. Type of antibody response after vaccination. Federation Proceedings, 14, 460.

F.M. DAVENPORT et E. MINUSE : (1964) ; Influenza viruses. In "Diagnostic Procedures for Viral and Ricketsial Diseases" (E.H. Lennette et N.J. Schmidt eds.), 3rd. ed. pp. 455-469. American Public Health Association N.Y.

EXPERT COMMITTEE ON RESPIRATORY VIRUS DISEASES (1959) : Methods of preparation of antisera for the comparison and typing of strains of influenza virus. Orgn. Mond. Santé, Séries du Rapport Technique, 170, 35-39.

A. FABIYI; F.S. LIEF et W. HENLE : (1958) : Antigenic analysis of influenza virus by complement fixation.2. The production of antisera to strain specific V antigen in guinea pigs. J. Immunol., 81, 467-477.

R.W. FAIRBROTHER et L. HOYLE : (1937) : Observation on the etiology of influenza. J. Path. Bact., 44, 213-223.

D. FEDOVA et B. TUMOVA : (1968) : Propagation of type A myxovirus influenzae in diploid cell strain WI-38. 2. The S and V antigens of fowl plague and A2/Singapore/1/57 virus as studied by immunofluorescence. Acta Virol., 12, 331-339.

G. FLEMING : (1871) : Cited by McQueen et coll. (1968).

P. FONTAINE et H.G. PETTERMANN : (1969) : Essais d'adaptation des virus de la grippe équine A des cellules de mammifères. Res. Vétér., 3, 1-11.

T.Jr. FRANCIS et T.P. MAGILL : (1936) : The incidence of neutralizing antibodies for human influenza virus in the serum of human individuals of different ages. J. exptl. Med., 63, 655-668.

T.Jr. FRANCIS et R.E. SHOPE : (1936) : Neutralization tests with sera of convalescent and immunized animals and the viruses of human and swine influenza. J. exptl. Med., 63, 645-653.

R.M. FRANKLIN et P.M. BREITENFELD : (1959) : The abortive infection of Earle's L cells by fowl plague virus. Virology, 8, 293-307.

K.B. FRASER : (1967 a) : Immunofluorescence of abortive and complete infections by influenza A virus in hamster BHK-21 and mouce L cells. J. gen. Virol., 1, 1.

K.B. FRASER : (1967 b): Defective and delayed myxovirus infections. British med. Bull., 23, 178.

C.R. GAUSH et T.F. SMITH : (1968) : Replication and plaque assay of influenza virus in an established line of canine kidney cells. Applied Microbiol., 16, 588-596.

W. GIBSON : (1754) : Cited by McQueen et coll. (1968).

H.S. GINSBERG et F.L.Jr. HORSFAL : (1949) : A labile component of normal serum which combines with various viruses. Neutralization of infectivity and inhibition of hemagglutination by the component. J. exptl. Med., 90, 475-495.

A. GOTTSCHALK : (1959) : Chemistry of virus receptors. In "The Viruses" (Burnet et Stanley eds.) Vol. 3. pp 55-61, A.P.; N.Y.

A. GRANOFF : (1955) : Plaque formation with influenza strains. Virology., 1, 252.

L. HANA et L. HOYLE : (1966) : The disintegration of internal ribonucleoprotein of influenza virus A with the production of serologically distinct components. Acta Virol., 10, 506-512.

R. HASS et H. WULFF : (1955) : The growth of influenza virus in tissue culture of ferret kidney cells. G. Microbiol., 1, 65-71.

R.B. HEATH et D.A.J. TYRRELL : (1959) : The behaviour of some influenza viruses in tissue cultures of kidney cells of various species. Arch. Ges. Virus forsch., 8, 577-591.

G. HELE; A. GIRARDI et W. HENLE : (1955) : A nontransmissible cytopathogenic effect of influenza virus in tissue culture accompanied by noninfectious hemagglutinins. J. exptl. Med., 101, 25-41.

W. HENLE et G. HENLE : (1949) : Studies on host virus interactions in the chick embryo influenza virus system. 3. Development of infectivity, hemagglutination and complement fixation activities during the first infectious cycle. J. exptl. Med., 90, 23-37.

W. HENLE et G. HENLE; E.B. ROSENBERG : (1947) : The demonstration of one step growth curves of influenza virus through the blocking effect of irradiated virus on further infection. J. exptl. Med., 86, 423-437.

A.V. HENNESSY: F.M. DAVENPORT; T.Jr. FRANCIS : (1955 b) : Studies on antibodies to strains of influenza virus in persons of different ages in sera collected in a post epidemic period. J. Immunol., 75, 401-409.

A.V. HENNESSY; F.M. DAVENPORT; T.Jr FRANCIS : (1955 a) : Persistant antibody orientation resulting from primary experience with influenza viruses. Federation Proceedings., 14, 465.

W.D. HILLS; M.A.J. MOFFAT et O.A. HOLTERMANN : (1960) : The development of soluble (S) and viral (V) antigens of influenza A virus in tissue culture as strudied vy fluorescent antibody technique. 3. On the abortive cycle of replication by the fluorescent antibody technique. Acta. Path. Microbiol. Scandinavia., 50, 419-428.

I. HINUMA et K. HUMMELER : (1961) : Studies of the complement fixing antigens of poliomyelitis. 3. Intracellular development of antigen. J. Immunol., 87, 367.

R.W. HINTZ et J.T. SYVERTON : (1959) : Mammalian cell cultures for study of influenza viruses. 1. Preparation of monolayer cultures with collagenase. 2. Virus propagation. Proc. Soc. exptl. Biol. Med., 101, 19-22, 22-26.

G.K. HIRST : (1941) : Agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryo infected with influenza viruses. Science, 94, 22-23.

G.K. HIRST : (1942 a) ; The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination. J. exptl. Med. 75, 49-64.

G.K. HIRST : (1942 b) ; Adsorption of influenza hemagglutinins and virus by red blood cells. J. exptl. Med., 76, 195-209.

G.K. HIRST : (1942 c) ; In ovo titration of influenza virus and of neutralizing antibodies in chick embryos. J. Immunol., 45, 285-292.

G.K. HIRST ; (1949) ; The nature of virus receptors of the red cells. 3. Partial purification of the virus agglutination inhibitor in human plasma. 4. Effect of sodium periodate on the elution of influenza virus from red cells. J. exptl. Med.89, 223-232; 233-243.

G.K. HIRST et E.G. PICKELS ; (1942) : A method for titration of influenza hemagglutinins and influenza antibodies with the aid of a photoelectric densitometer. J. Immunol., 45, 273-283.

O.A. HOLTERMANN; W.D. HILLS et M.A.J. MOFFAT : (1960) : The development of soluble (S) and viral (V) antigens of influenza A virus in tissue culture as studied by the fluorescent antibody technique. 1. Studies employing a low multiplicity of infection in beef embryo kidney cells. Acta Path. Microbiol. Scandinavia., 50, 389-408.

R.W. HORNE et P. WILLY : (1963) : Virus structure revealed by negative staining. Advances in Virus Research, 10, 101-107.

S. HORVATH : (1958) : Tissue culture and influenza virus studies. Z. ges. inn. Med., 9, 3116.

C. HOWE; L.T. LEE; H.M. ROSE : (1961 a) : Collocalia mucoid. A substance for myxovirus neuraminidase. Arch. Biochim. Biophys., 95, 512-520.

C. HOWE; H.M. ROSE; L.T. LEE : (1961 b) : Observation on the relationship between hemagglutinin and neuraminidase of influenza viruses. Proc. Soc. exptl. Biol. Med., 108, 420-425.

L. HOYLE : (1945) : An analysis of the complement fixation reaction in influenza. J. Hyg. (London), 44, 170-178.

L. HOYLE : (1948) : The growth cycle of influenza A. A study of the reactions between virus, soluble antigen and host cell in fertile eggs inoculated with influenza virus. British. J. exptl. Path. 29, 390-399.

L. HOYLE : (1949) : Growth cycle of influenza A. Nature (London), 164, 1137.

L. HOYLE : (1950) : The multiplication of influenza virus in fertile egg. J. Hyg. (London), 48, 277-297.

L. HOYLE: (1952 a) : The multiplication of influenza virus considered in relation to general problems of biological multiplication. Second Sympo. Soc. gen. Microbiol. "The nature of virus multiplication"., 225-248.

L. HOYLE : (1952 b) : Structure of influenza virus. The relation between biological activity and chemical structure of virus fractions. J. Hyg., 50, 229-245.

L. HOYLE : (1952 c) : The multiplication of complement fixing antigen and red cell agglutinin in the chorioallantoic membrane of fertile eggs inoculated with influenza virus. J. Path. Bact., 64, 419-422.

L. HOYLE : (1968) : "The Influenza Virus". (Springer-Verlag Wein, N.Y. Publication).

L. HOYLE et R.W. FAIRBROTHER : (1937) : Antigenic structure of influenza viruses. The preparation of elementary body suspensions and the nature the complement fixing antigens. J. Hyg. (London)., 37, 512-520.

L. HOYLE et R.W. FAIRBROTHER : (1947) : Serological diagnosis of epidemic influenza by the complement fixation reaction. British med. J. 991.

R.R. HYDE et A. CHAPMAN : (1937) : Behaviour of certain filterable agents from cases of colds and influenza isolated directly from man to chick membranes. American J. Hyg., 26, 116.

INTERNATIONAL SUBCOMMITTEE ON VIRUS NOMENCLATURE : (1963) : International bulletin of bacterial Nomenclature and Taxonomy, 13, 217.

A. ISAACS et A. BOZZO : (1951) : The use of Vibrio cholerae filtrates in the destruction of non-specific inhibitor in ferret sera. British J. exptl. Path., 32, 325-335.

K.E. JENSEN et T. Jr. FRANCIS : (1953) : Antigen-antibody precipitates in solid medium with influenza virus. J. Immunol., 70, 321-325.

L.E. KAMFORIN : (1968) : Characteristics of various fluorescent antibody techniques used in investigating influenza virus multiplication in chick embryo kidney cell cultures. Acta Virol., 12, 144-150.

M.M. KAPLAN et A.M.M. PAYNE : (1959) : Serological survey in animals for type A influenza in relation to the 1957 pandemic. Bull. Organ. mond. Sante, 20, 465-488.

J.A. KASEL; R.M. ALFORD; V. KNIGHT; G.H. WADDELL; M.M. SIGEL : (1965) : Experimental infection of human volunteers with equine influenza virus. Nature (London), 206, 41-43.

J.A. KASEL; R.V. FULK et R.V. COUCH : (1969) : Antigenic relationship between the equine and Hong Kong human variants of influenza type A2 virus. J. Immunol., 102, 530-532.

C.A. KNIGHT : (1946) : Precipitin reactions of highly purified influenza virus and related materials. J. exptl. Med., 83, 281-294.

J.S. KOEN : (1919) : A practical method for field diagnosis of swine disease. J. American vet. Med. Assn., 14, 468-470.

W.G. LAVER et R.G. WEBSTER : (1966) : The structure of influenza virus . 4. Chemical study of the host antigen. Virology., 30, 104-115.

F. LEHMANN-GRUBE : (1964) : Influenza virus in cell cultures. 2. use of calf Kidney cells for quantal assay. Arch. ges. virusforsch, 14, 177-188.

F. LEHMANN-GRUBE et FAZEKAS DE St. GROTH,S.: (1965) : Influenza viruses in cell culture. 3. Propagation incalf kidney cells. Arch. ges. Virusforsch., 17, 534-548.

E.H. LENNETTE et F.L.Jr. HORSFALL : (1940) : Studies on epidemic influenza virus. The nature and properties of the complement fixing antigen. J. exptl. Med., 72, 233-246.

P. LEPINE et J. MAURIN : (1964) : La poliomyélite : In "Technique de Laboratoire en Virologie Humaine", dirige par P. Lepine. PP. 463-515 (eds. Masson et Cie., Paris).

F.S. LIEF : (1963) : Antigenic analysis of influenza viruses by complement fixation. 7. Further studies on production of pure anti S-serum and specificity of type A S-antigen. J. Immunol., 90, 172-177.

F.S. LIEF et D. COHEN : (1965) : Equine influenza. Studies of the virus and of antibody patterns in convalescent, interepidemic and postvaccination sera. American. J. Epidemiol., 82, 225-246.

F.S. LIEF; A. FABIYI et W. HENLE : (1958) : Antigenic analysis of influenza virus by complement fixation. 1. The production of antibodies to the soluble antigen in guinea pigs. J. Immunol. 80, 53-65.

F.S. LIEF et W. HENLE : (1956) : Studies on the soluble antigen of influenza viruses. 1. The release of S antigen from elementary bodies by treatment with ether. Virology., 2, 753-771.

F.S. LIEF et W. HENLE :(1959) : Methods and procedures for use of complement fixation techniquein type and strain specific diagnosis of influenza. Bull. Orgn. Mond. Santé., 20, 411-420.

K.A. LIM; Y.C. CHAN; W.O. PHOON et E. HANAM : (1964) : Dengu type virus isolated in Singapore. Bull. Orgn. Mond. Santé., 30, 227-240.

C. LIU : (1955) : Studies on influenza infection in ferrets by means of fluorescin-labelled antibody. 1. The pathogenesis and diagnosis of the disease. 2. The role of soluble antigen in nuclear fluorescence and cross reactions. J. exptl. Med., 101, 665-675; 677-685.

L. McCLELLAND et R. HARE : (1941) : Adsorption of influenza virus by red cells and a new in vitro method of measuring antibodies for influenza virus. Canadian publ. Hlth. J. 32, 530-538.

J.L. MCQUEEN : (1965) : Human virus diseases in large animals. Discussion of scientific papers presented at the first annual symposium on Applied Virology. In "Applied Virology" (Sanders Lennette eds). Olympic press, Sheboygan, Wisconsin.

J.L. MCQUEEN; F.M. DAVENPORT et E. MINUS : (1965) : Studies on equine influenza in Michigan, 1963. 1. Etiology. American J. Epidemiol. 83, 271-279.

J.L. MCQUEEN; H.S. KAYE; M.T. COILMAN et W.R. DOWDLE : (1969) : Immunology of equine influenza. J. American vet. Med. Assn., 115, 265-271.

J.L. MCQUEEN; J.H. STEELE et RQ ROBINSON : (1968) : Influenza in animals. Advances in Vet. Res., 12, 285-336.

E. MINUSE; J.L. MCQUEEN; F.M. DAVENPORT et T.Jr. FRANCIS : (1965) : Studies on antibodies to 1956 and 1963 influenza viruses in horses and man. J. Immunol., 94, 563-566.

W.J. MOGABGAB; I.J. GREEN; O.C. DIERKHISING et I.A. PHILLIPS : (1955) : Isolation and cytopathogenic effect of influenza B virus in monkey kidney cultures. Proc. Soc. exptl. Biol. Med. (N.Y.), 89, 654-659.

H.G. PEREIRA : (1969) : Influenza. Antigenic spectrum. Prog. Med. Virol., 11, 46-79.

H.G. PEREIRA; G. LANG; O.M. OLESIUK; D.H. ROBERTS; G.M. SNOEYENBES et B.C. ESTERDAY : (1966) : New antigenic variants of avian influenza A viruses. Bull. Orgn. Mond. Santé, 35, 779-802.

H.G. PEREIRA; A. RINALDI; L. NARDELLI : (1967) : Antigenic variations amongst avian influenza A viruses. Bull. Orgn. Mond. Santé, 37, 553-558.

J. PETT et P. TEUFEL : (1966) : Culture of influenza virus in tissue culture : Preliminary communication. Berl. Münch. tierarztl. Wschr. 79, 473-474.

A. RINALDI; G. SERVIO et G. MANDWLLI : (1965) : Observazioni ed isolamento del virus N (Dinter, 1949) da un focolaio di sinusite infettiva nelle anatre. Estv. Selez. vet., 6, 430.

M.A. ROSE : (1966) : Serological studies with equine influenza. British vet. J., 122, 435-442.

J.E. SALK : (1944) : A simplfied procedure for titrating hemagglutinating capacity of influenza virus and the corresponding antibody J. Immunol., 49, 87-89.

G.C. SCHILD et H.G. PEREIRA : (1969) : Chacterisation of the ribonucleoprotein and neuraminidase of influenza A virus by immunodiffusion. J. gen. Virol., 4, 355-363.

A.A.C. SAMPAIO et A. ISAACS : (1953) : The use of trypsin on normal serum inhibirors of influenza virus hemagglutination. British J. exptl. Pathol., 34, 152-158.

W. SCHAFER : (1955) : Vergleichene seroimmunologische untersuchungen uber die viren der influenza und klassischen gelflugelpest. Z. Naturforsch, 10 b, 81-91.

B. SAMADIEH et R.A. BANKOWSKI : (1971) : Identification of influenza A viruses by immunodiffusion test. American. J. Vet. Res., 32, 497-484.

G.C. SCHILD et C.H. STUART-HARRIS : (1965) : Serological epidemiological studies with influenza A viruses. J. Hyg. (London), 63, 479-490.

J.T. SETO; R. DRZENIEK et R. ROTT : (1966) : Isolation of a low molecular weight sialidase (neuraminidase) from influenza virus. Biochim. Biophys. Acta, 113, 402-404.

J.T. SETO et R. ROTT : (1966) : Functional synthesis of sialidase during influenza virus multiplication. Virology, 30,731-737.

A. SHELOKOV; J.E. VOGEL et L. CHI : (1958) : Hemadsorption (adsorption-hemagglutination) test for viral agents in tissue-culture with special reference to influenza. Proc. Biol. Med (N.Y.) 97, 802-809.

R.E. SHOPE : (1936) : The incidence of neutralizing antibodies for swine influenza virus in the sera of human beings of different ages. J. exptl. Med., 63, 669-684.

W. SMITH; C.H. ANDREWES et P.P. LAIDLAW : (1933) : A virus obtained from influenza patients. Lancet, 66-68.

W. SMITH; C.H. ANDREWES et P.P. LAIDLAW : (1935) : Influenza experiments on the immunization of ferrets and mice. British J. exptl. Path. 16, 291-304.

W. SMITH; G. BELYAVIN et F.W. SCHEFFIRLD : (1953) : A host protein component of influenza viruses. Nature (London), 127, 669-670.

O. SOVINOVA; B. TUMOVA; F POUTSKA et J. NEMEC : (1958) : Isolation of a virus causing respiratory disease in horses. Acta Viro. 2, 54-61.

J.D. STONE : (1949) : Inhibition of influenza virus hemagglutination by mucoides. 1. Conversion of virus to indicator for inhibitor Australian J. exptl. Biol. Med. Sc. 27, 337-352.

C.S. STULBERG et R. SCHAPIRA : (1953) : Virus growth in tissue culture fibroblastes. 1. Influenza A and herpes simplex viruses. J. Immunol. 70, 51-59.

B. STYK; D. BLASKOVIC; A. SABO; L. HANA; B. KAPITANCIK et M. KAPLAN : (1970 a) : Experimental infection of horses with A-Equi2/Miami/63 and human A2/Hong Kong/1/68 influenza viruses.3. Immunodiffusion study of the antibody response. Acta Virol., 14, 35-46.

B. STYK; D. BLASKOVIC; L. HANA; J. JAKUBKA et M. SEDILEKOVA : (1970 b) : Antigenic structure of influenza virus. An immundiffusion study, Acta. Virol., 14, 194-208.

B. STYK et L. HANA : (1966) : Immunodiffusion studies on the reaction of influenza virus with specific antibody and nonspecific beta-inhibitors. Acta Virol., 10, 281-290.

B. STYK; L. HANA; M. SEDILEKOVA : (1968) : Antibody responses to natural influenza A2 infection of man as studied by gel double diffusion. Acta Virol., 12, 208-213.

A. SUGIURA; C. ENOMOTO et M. AYAI: (1962) : Development of influenza virus antigen in tissue culture cells followed with the aid of fluorescent antibody technique. Japanesse. J. exptl. Med., 32, 415-432.

SUHARTO; B. TUMOVA : (1967) : The use of tissue cultures for the separation of V and S influenza antigens. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 11, 254-256.

P. TAUFEL : (1968) : Propagation of influenza A-equi virus in cell culture. Inag. Dis. tierarztl. Fak. Munchen pp. 51. (Vet. Bull. 39, Abstract no. 3332).

R.M. TAYLOR et A.S. PARODI : (1942) : Use of hamster (Cricetus auratus) for detection of influenza virus in throat washings. Proc. Soc. exptl. Biol. Med. (N.Y.), 49, 105-108.

M.I. TRAVER; R.L. NORTHOAP et D.L. WALKER : (1960) : Site of intracellular antigen production by myxovirus. Proc. Soc. exptl. Biol. Med. (N.Y.)., 104, 2678-273.

B. TUMOVA et EASTERDAY : (1969). Relationship of envelope antigens of animal influenza viruses to human A_2 influenza strains isolated in the year 1957-1968. Bull. Organ. Monde. Santé., 41, 429-435.

B. TUMOVA et D. FEDOVA : (1968) : Propagation of type A myxovirus influenzae in diploid cell strain WI-38. 1. Adaption experiments with strains of human and animal origin. Acta Virol., 12, 324-330.

B. TUMOVA et H.G. PEREIRA : (1968) : Antigenic relationship between influenza A viruses of human and animal origin. Bull. Organ.Mond. Santé., 38, 415-420.

D.A.J. TYRRELL : (1954) : Separation of inhibitors of hemagglutination and specific antibodies for influenza viruses by starch zone electrophoresis. J. Immunol., 72, 494-502.

VIRUS SUBCOMMITTEE OF THE INTERNATIONAL NOMENCLATURE COMMITTEE : (1963) : Recommendations of virus nomenclature. Virology, 21, 516-517.

J. VOGEL et A. SHELOKOV : (1957) : Adsorption-hemagglutination test for influenza virus in monkey kidney tissue cultures. Science, 126, 358-359.

D.W. VOTH et H.A.FELDMAN : (1963) : Aqueous, repository and placebo influenza vaccines in an elderly population. American. J. Publ. Hlth., 53, 1512.

G.H.WADDELL; M.B. TEIGLAND et M.M. SIGEL : (1963) : A new influenza virus associated with equine respiratory disease. J. American vet. Med. Assn., 143, 586-590.

C. WADSWORTH : (1937) : A slide microtechnique for the analysis of immune precipitates in gel. Inst. Arch. Allergy, 10, 355-360.

B.K. WATSON et A.H. COONS : (1954) : Studies on influenza virus infection in the chick embryo using fluorescent antibody. J. exptl. Med., 99, 419-427.

R.G. WEBSTER et W.G. LAVER : (1967) : Preparation and properties of antibodies directed specifically against the neuraminidase of influenza viruses. J. Immunol., 99, 49-55.

R.G. WEBSTER et W.G. LAVER : (1971) : Antigenic variation in influenza virus, biology and chemistry. Prog. Med. Virol., 13, 271-338.

R.G. WEBSTER et H.G. PEREIRA : (1968) : A commun surface antigen in influenza viruses of human and avian sources. J. gen. Viro., 3, 201-208.

H.L. WEINBERGER; E.L. BUESCHER et V.M. EDWARDS : (1965) : Extent of antigenic variation of A2-influenza viruses from prototype strains. J. Immunol., 94, 47-54.

S.C. WONG et E.D. KILBOURNE : (1961) : Changing viral susceptibility of human cell line in continuous cultivation. 1. Production of infective virus in a variant of a conjunctival cell following infection with swine or NSW influenza viruses. J. exptl . Med., 113, 95-110.